

UNIVERSITE **BLAISE PASCAL**

UNIVERSITE D'AUVERGNE

Année 2009

N° d'ordre

*ECOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

N° d'ordre

*Thèse*

Présentée à l'Université d'Auvergne  
Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialités : Biotechnologies, Nutrition et Santé

Soutenue le 17 Avril 2009

**Marie GERARD-CHAMPOD**

---

**Caractérisation et modélisation *in vitro*  
de l'écosystème jéjuno-iléal du veau de boucherie  
Application : impact sur la microflore modélisée  
d'un additif alternatif aux antibiotiques facteurs de croissance : le carvacrol**

---

Rapporteurs : Pr. Christophe LACROIX  
Pr. Sergio CALSAMIGLIA

Membres du jury : Pr. Marie-José BUTEL  
Pr. Evelyne FORANO  
Pr. Monique ALRIC (Directrice de thèse)

Thèse sous contrat CIFRE en collaboration avec **PANCOSMA S.A**

**Equipe de Recherche Technologique  
"Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament" (ERT CIDAM)  
Faculté de Pharmacie – CRNH Auvergne – IFR Santé – Université d'Auvergne**

*A mon grand-père, papi Gilbert...*

# REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier Messieurs les Professeurs Christophe Lacroix et Sergio Calsamiglia pour avoir accepté la tâche laborieuse d'être les rapporteurs de mon travail de thèse.

Je remercie également le Docteur Evelyne Forano et le Professeur Marie-Jose Butel d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également PANCOSMA SA, qui a financé ce projet, et en particulier l'ancienne équipe d'AXISS France, qui a lancé ce projet et m'a soutenue dans mes débuts.

Je tiens à remercier le Professeur Monique Alric, ma directrice de thèse, pour son aide et son soutien dans tous les moments difficiles de cette thèse (et il y en a eu !!). Merci de m'avoir accueillie aussi chaleureusement au sein du laboratoire.

Je tiens adresser un mot tout particulier à Adri van de Braak, qui m'a beaucoup soutenue et m'a demandé beaucoup de nouvelles malgré la distance. J'ai été très touchée et je vous souhaite une retraite heureuse, entouré de votre famille !

Merci également à son équipe : Arjan Gobius du Sart, Peter Mölder et plus particulièrement Lot Bos avec qui j'ai passé de très bons moments lors de mes séjours aux Pays-Bas.

Un grand merci à Emilie Moussard, qui a passé beaucoup de temps à obtenir des informations dont j'avais besoin, et qui a toujours été disponible pour m'aider.

Je tiens à remercier également les vétérinaires Stéphane Floc'h, qui m'a appris à manipuler les entrailles des veaux, et Nicolas Poumerol, toujours très disponible.

Merci à Franck Morel, qui s'est occupé de trouver tous les veaux dont j'avais besoin et qui a pris de son temps pour que tout se déroule correctement.

Un grand merci tout particulier à Roland Jailler, directeur de l'abattoir de l'INRA, qui a toujours tout fait pour rendre les abattages des veaux possibles, malgré des plannings surchargés. Merci pour tout.

Merci également à mon abatteur préféré, Cédric Coustet, qui a permis que mes moments passés à l'abattoir soient empreints d'humour et de fous rires. C'était vraiment sympa !

Un grand merci également à Stéphanie Blanquet-Diot, pour avoir pris beaucoup de son temps pour corriger toutes mes communications, et en particulier mes articles et mon manuscrit. J'ai souvent eu du mal à te relire mais tes conseils ont toujours été très bénéfiques.

Je tiens à remercier Jean-Michel Cardot, qui m'a guidée dans la réalisation des nombreuses analyses statistiques et qui a pris de son temps pour moi.

Merci beaucoup à Eric Beyssac qui m'a trouvé un travail pour la fin de ma thèse. Je n'aurais pu en trouver si tôt sans cette aide, qui est très précieuse dans le contexte actuel.

Je remercie tout particulièrement Sophie Gonzalez-Bafoil et Antoine Bernardin, qui ont été pour moi des stagiaires exemplaires et qui m'ont apporté toute leur aide avec beaucoup de volonté et avec qui j'ai passé de très bons moments.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire, et en particulier :

- Sylvain qui m'a conseillée pour la mise en route des fermenteurs,
- Jean-François Brugère pour ses discussions sans fin de politique auxquelles je n'ai jamais rien compris et pour toutes ces batailles verbales auxquelles nous nous sommes livrés,
- Jean-François Jarrige, notre sexe-symbole, que j'adore et qui me fera toujours rire,
- Géraldine pour les moments passés ensemble,
- Ghislain, avec qui j'ai beaucoup rigolé,
- Pascale, pour ses bons petits plats et ces petits moments de détente quotidiens.

Je souhaite remercier de tout mon cœur mes parents, qui m'ont toujours soutenue et qui ont toujours été fiers de moi. C'est grâce à vous que je suis ici aujourd'hui, merci pour tous les efforts que vous avez fournis, et merci de me pardonner tous mes moments d'oubli de cette dernière année, j'espère que ça va vite passer !

Merci à ma petite Paulette, ma meilleure amie, qui a toujours été là pour moi et qui m'a empêchée de tout arrêter quand tout allait de travers. J'espère qu'on aura plus de temps pour se voir maintenant que nos thèses sont finies !

Un grand merci à ma Poupoule, Agnès, encore connue sous le nom de Joey. Cette thèse aura au moins eu l'avantage de me faire te rencontrer. Merci pour tout, nos moments de délire à danser et chanter dans l'aquarium, nos pauses clope, nos moments de défoulement, nos moments de déprime et nos soirées du vendredi, et pour tous tes passages quotidiens à la maison pour fumer une clope. Je t'aime fort comme un camion américain !

Et enfin, merci à Yann, mon mari, pour tout le temps qu'il a pris pour m'aider au laboratoire, les samedis matin et les soirs tard, pour avoir supporté toutes les nuits où je me levais à 2 heures du mat pour le boulot, pour tous les moments où il m'a donné du courage pour avancer dans cette galère, et surtout pour sa patience, sans fin, à supporter mes sautes d'humeur. Je t'aime à la folie des gros plein des bons milliards 1000.50 !!!



# TABLE DES MATIERES

RESUME.....	i
ABSTRACT .....	i
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	ii
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	iv
 Avant-propos.....	 1

## ETAT DE L'ART

### Chapitre I :

<b>Le veau de boucherie</b> .....	4
I-1. Elevage du veau de boucherie .....	4
I-2. Alimentation du veau de boucherie .....	6
I-3. Digestion chez le veau de boucherie .....	7
I-3.1 Anatomie du système digestif.....	7
I-3.2 Digestion des aliments.....	8

### Chapitre II :

<b>Les antibiotiques facteurs de croissance (AFCs)</b> .....	12
II-1. Utilisation des antibiotiques facteurs de croissance.....	12
II-2. Mode d'action .....	13
II-2.1 Diminution de la prévalence des infections endémiques sub-cliniques.....	14
II-2.2 Réduction de la production de métabolites toxiques.....	15
II-2.3 Augmentation de la disponibilité des nutriments pour l'hôte .....	15
II-2.4 Amélioration de l'absorption intestinale .....	16
II-2.5 Inhibition de la réponse inflammatoire .....	16
II-3. Implication des AFCs dans l'apparition de résistances bactériennes aux antibiotiques .....	17
II-4. Evolution de la réglementation .....	19
II-5. Conséquences des réglementations .....	20
II-5.1 Conséquences sur la résistance antibactérienne .....	20
II-5.2 Conséquences sur les performances et la santé des animaux.....	21
II-6. Candidats au remplacement des AFCs.....	22
II-6.1 Oligo-éléments .....	23
II-6.2 Enzymes .....	23
II-6.3 Acidifiants .....	24
II-6.4 Prébiotiques.....	24
II-6.5 Probiotiques.....	26
II-6.6 Plantes et extraits de plantes.....	28
II-6.7 Un extrait d'huile essentielle particulier : le carvacrol .....	30

### **Chapitre III :**

<b>La microflore du veau et les pathologies digestives liées .....</b>	<b>34</b>
III-1. Mise en place de la microflore intestinale .....	35
III-2. Microflore du tractus digestif du veau .....	36
III-2.1 Grands groupes microbiens identifiés chez le veau .....	37
III-2.2 Caractéristiques métaboliques des groupes microbiens dénombrés dans le tractus digestif du veau.....	39
III-3. Avantages et inconvénients associés au microbiote intestinal.....	44
III-3.1 Avantages.....	45
III-3.2 Inconvénients .....	47
III-4. Pathologies digestives du veau d'origine bactérienne .....	49
III-4.1 Entéroxémie bovine .....	50
III-4.2 Infections à <i>E. coli</i> ou colibacillooses.....	52

### **Chapitre IV :**

<b>La modélisation de l'écosystème intestinal .....</b>	<b>55</b>
IV-1. Modèles <i>in vivo</i> .....	55
IV-2. Modèles <i>in vitro</i> .....	56
IV-2.1 Systèmes « batch ».....	57
IV-2.2 Systèmes semi-continus.....	59
IV-2.3 Systèmes continus.....	61
IV-2.4 Système dynamique .....	64

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **Chapitre I :**

Dénombrement des principaux groupes bactériens cultivables et caractérisation de certains paramètres abiotiques du contenu jéjuno-ileal des veaux de boucherie (Article 1).....	68
---	----

### **Chapitre II :**

Développement d'un système de fermentation <i>in vitro</i> modélisant l'écosystème jéjuno-iléal du veau de boucherie : Comparaison avec les données <i>in vivo</i> (Article 2).....	98
---	----

### **Chapitre III :**

Impact du carvacrol sur la microflore du veau de boucherie modélisée dans un système de fermentation <i>in vitro</i> .....	131
--	-----

<b>Conclusions et Perspectives .....</b>	<b>151</b>
--	------------

<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>157</i>
---	------------

<i>Annexes.....</i>	<i>187</i>
---------------------	------------





## RESUME

Dans le secteur du veau de boucherie, l'interdiction par l'Union Européenne en Janvier 2006 des antibiotiques utilisés comme facteurs de croissance (AFCs) a déclenché la recherche de nouveaux additifs alimentaires permettant de retrouver les performances de croissance des animaux et de réduire l'incidence des pathologies gastro-intestinales.

Afin de réaliser un screening à grande échelle de ces additifs, l'objectif de ces travaux était de mettre au point un système de fermentation continu modélisant *in vitro* l'environnement intestinal du veau de boucherie.

Les principaux groupes bactériens cultivables et les paramètres majeurs de la composition biochimique du contenu jéuno-iléal ont tout d'abord été caractérisés *in vivo*. Ensuite, un système de fermentation *in vitro* a été mis au point et son milieu nutritif optimisé. Trois milieux nutritifs testés ont conduit à une stabilisation des grands groupes bactériens dénombrés. Le milieu M3 a été choisi pour la suite des expériences en raison de sa composition très proche de celle du contenu jéuno-iléal des veaux et parce qu'il a conduit à une faible variabilité inter-réplicats.

Le modèle a ensuite été utilisé afin d'étudier l'impact, sur la microflore du veau de boucherie, d'un additif alimentaire : le carvacrol. Les résultats de ce premier essai se sont avérés difficilement exploitables car le pouvoir antioxydant du carvacrol en a faussé l'interprétation. Avec l'ajout d'un antioxydant plus fort que le carvacrol dans le milieu nutritif, l'impact du carvacrol sur la microflore devrait pouvoir être analysé.

Même si des améliorations restent à effectuer, les premiers résultats sont très prometteurs. Après screening *in vitro* et choix de nouveaux additifs susceptibles de remplacer les AFCs, des essais *in vivo* devront être effectués pour valider l'intérêt des substances sélectionnées *in vitro*. En effet, la modélisation *in vitro* ne simule pas tous les phénomènes ayant lieu *in vivo* et reste un outil de « pré-screening » en amont.

Mots clés : veau de boucherie, modèle *in vitro*, microflore intestinale, antibiotiques facteurs de croissance, additifs alimentaires.

## ABSTRACT

In the veal calves industry, the European ban in January 2006 of all antibiotics used as growth promoters (AGPs) gave rise to research into new feed additives allowing i) to reach the same growth performances in animals and ii) the decrease of gastro-intestinal disorders frequency.

The objective of this work was to set up a continuous *in vitro* system modelling the veal calf intestinal environment in order to screen a large number of additives.

The main cultivable bacterial groups and major parameters of the biochemical composition of the jejuno-ileal chyme were first characterized *in vivo*. Then, a continuous *in vitro* system was set up and its nutritive medium was optimised. The three tested nutritive media led to the stabilization of the main numbered bacterial groups. Medium M3 was chosen for the following experiments as its biochemical composition was closest to that of the calf chyme and because it led to the lowest inter-trials variability.

The model was then used in order to study the impact, on the intestinal microflora of the veal calf, of a feed additive: carvacrol. The results of this first trial were difficult to use as the antioxidant proprieties of carvacrol distorted their interpretation. Adding a molecule with greater antioxidant proprieties than carvacrol in the nutritive medium should enable the analysis of the impact of carvacrol on the microflora.

Even if improvements remain to be made, the first results are promising. After *in vitro* screening and the selection of new feed additives liable to replace AGPs, *in vivo* experiments are needed to validate the interest of the substances selected *in vitro*. Indeed, *in vitro* modelling does not mimic all the phenomena occurring *in vivo* and remain a pre-screening tool up stream.

Key words: veal calf, *in vitro* model, intestinal microflora, antibiotics growth promoters, feed additives.

## ***LISTE DES ABBREVIATIONS***

<b>AA</b>	Acide Aminé ou Amino Acid
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>AEEC</b>	Attaching and Effacing Escherichia coli
<b>AFC</b>	Antibiotique facteur de croissance
<b>AFLP</b>	Amplified Fragment Length Polymorphism
<b>AGCC</b>	Acide gras à courte chaîne
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BEA</b>	Bile Esculine Azide
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion
<b>BMS</b>	Bacteroides Mineral Salt
<b>C10H14O</b>	Carvacrol ou 5-isopropyl-2-méthylphénol
<b>CFU</b>	Colony Forming Unit
<b>CH<sub>4</sub></b>	Méthane
<b>Cl. perfringens</b>	Clostridium perfringens
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone
<b>CRNH</b>	Centre de Recherche en Nutrition Humaine
<b>DGGE</b>	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
<b>DM</b>	Dry Matter
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EHEC</b>	Escherichia coli entérohémorragique
<b>EPEC</b>	Escherichia coli entéropathogène
<b>ERT CIDAM</b>	Equipe de Recherche Technologique « Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament »
<b>ESM</b>	Erreur Standard sur la Moyenne
<b>ETEC</b>	Escherichia coli entérotoxinogène
<b>FISH</b>	Fluorescent In Situ Hybridization
<b>FOS</b>	Fructo-oligosaccharide

<b>GAS</b>	Galacto-oligosaccharide
<b>GMQ</b>	Gain Moyen Quotidien
<b>GOS</b>	Gluko-oligosaccharide
<b>GRES</b>	Entereococcus faecium glycolipide-résistant
<b>H<sub>2</sub></b>	Dihydrogène
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau
<b>HDL</b>	Lipoprotéine de haute densité
<b>IC</b>	Indice de consommation
<b>IFR</b>	Institut Fédératif de Recherche
<b>ITP</b>	Institut Technique du Porc
<b>MIC</b>	Minimum Inhibitory Concentration
<b>MOS</b>	Mannan-oligosaccharide
<b>O<sub>2</sub></b>	Dioxygène
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>SCFA</b>	Short Chain Fatty Acids
<b>SEM</b>	Standard Error of the Mean
<b>TGY</b>	Tryptone-Glucose-Yeast
<b>TIM</b>	TNO gastro-Intestinal Model
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie
<b>VL</b>	Viande Levure
<b>VLDL</b>	Lipoprotéines de faible densité

# LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

## ETAT DE L'ART

<b>Figure 1</b>	Filière du veau	4
<b>Figure 2</b>	Pays importateurs et exportateurs de jeunes veaux au sein de l'Union Européenne en 2008	5
<b>Figure 3</b>	Système gastrique d'un veau de 8 semaines ayant un régime alimentaire mixte : aliment d'allaitement et fibres	7
<b>Figure 4</b>	Système intestinal du veau de boucherie	8
<b>Figure 5</b>	Sécrétions biliaire et pancréatique, digestion des macronutriments et absorption des produits de digestion chez le veau	9
<b>Figure 6</b>	Mode d'action présumé des AFCs	13
<b>Figure 7</b>	Volume d'AFCs utilisés chez les animaux d'élevage au Danemark et prévalence d' <i>Enterococcus faecium</i> résistant à des antibiotiques dans les fèces d'animaux en bonne santé à l'abattage de 1995 à 2001	20
<b>Figure 8</b>	Pourcentage d'échantillons positifs à <i>Entérocooccus faecium</i> résistant à la vancomycine (glycopeptide) dans les fèces humains aux Pays-Bas et en l'Allemagne, et chez des patients hospitalisés en Belgique, suite à l'interdiction de l'avoparcine (glycopeptide) comme AFC	20
<b>Figure 9</b>	Formule chimique du carvacrol ou 5-isopropyl-2-methylphenol (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O)	30
<b>Figure 10</b>	Groupes bactériens dénombrés dans le tractus gastro-intestinal des veaux	37
<b>Figure 11</b>	Mise en évidence de l'effet barrière au niveau du tube digestif	45
<b>Figure 12</b>	Modèle <i>in vitro</i> semi-continu mis au point par Miller et Wolin (1981)	59
<b>Figure 13</b>	Modèle <i>in vitro</i> continu mis au point par Macfarlane et al. (1998) pour la modélisation du côlon humain	61
<b>Figure 14</b>	Système TIM1 modélisant l'estomac et l'intestin grêle	64
<b>Figure 15</b>	Système TIM2 modélisant le côlon humain	64

<b>Tableau 1</b>	Principales caractéristiques du veau de boucherie	<b>4</b>
<b>Tableau 2</b>	Antibiotiques facteurs de croissance utilisés dans l'Union Européenne avant leur interdiction	<b>12</b>
<b>Tableau 3</b>	Additifs alimentaires candidats au remplacement des AFCs	<b>22</b>
<b>Tableau 4</b>	Principales caractéristiques des principaux groupes bactériens ou espèces dénombrés dans le tractus gastro-intestinal du veau	<b>39</b>
<b>Tableau 5</b>	Rôle des différentes bactéries de la flore intestinale dans le développement du système intestinal plasmocytaire à IgA	<b>46</b>
<b>Tableau 6</b>	Avantages et inconvénients des différents modèles pouvant aider à l'étude d'un écosystème intestinal complexe	<b>55</b>
<b>Tableau 7</b>	Exemples de modélisation d'écosystèmes digestifs animaux mis en place pour sélectionner des additifs alimentaires modifiant la microflore ou son métabolisme	<b>57</b>
<b>Tableau 8</b>	Principaux paramètres digestifs reproduits dans les systèmes TIM	<b>65</b>

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

---

### Chapitre I

<b>Figure 1</b>	Effect of fasting time on the concentrations of fermentative metabolites in the jejuno-ileal content of veal calves	<b>81</b>
<b>Figure 2</b>	Dry matter composition of the jejuno-ileal content of veal calves	<b>82</b>
<b>Figure 3</b>	Amino acid profile of the jejuno-ileal content of veal calves	<b>82</b>
<b>Figure 4</b>	Fatty acid profile of the jejuno-ileal content of veal calves	<b>82</b>
<b>Figure 5</b>	Mineral composition of ash from the jejuno-ileal content of veal calves	<b>83</b>
<b>Figure 6</b>	Effect of fasting time on the intestinal microflora of veal calves	<b>85</b>
<b>Table 1</b>	Bacterial groups-associated culture conditions	<b>76</b>
<b>Table 2</b>	Effect of fasting time on the pH and redox potential of the jejuno-ileal content of 22 week-old veal calves	<b>81</b>
<b>Table 3</b>	Concentrations of the main cultured bacterial groups in the jejuno-ileal content of 22-week-old veal calves after 24 h fasting	<b>83</b>
<b>Table 4</b>	Concentrations of the main cultured bacterial groups in the jejuno-ileal content of 22-week-old veal calves after 12 h fasting	<b>84</b>
<b>Table 5</b>	Concentrations of the main cultured bacterial groups in the jejuno-ileal content of 22-week-old veal calves after 6 h fasting	<b>84</b>
<b>Table 6</b>	Comparison of the data obtained in our study and those found in the literature on the intestinal microflora of veal calves	<b>89</b>

## Chapitre II

<b>Figure 1</b>	Continuous in vitro system	<b>107</b>
<b>Figure 2</b>	Biochemical composition of the three nutritive media (n=1) and of the jejunoileal content of veal calves (n=12)	<b>112</b>
<b>Figure 3</b>	Amino acid profile of the three nutritive media (n=1) and of the jejunoileal content of veal calves (n=12)	<b>112</b>
<b>Figure 4</b>	Fatty acid profile of the three nutritive media (n=1) and of the jejunoileal content of veal calves (n=12)	<b>113</b>
<b>Figure 5</b>	Concentrations of the main cultured microbial groups during fermentations with M1 (n=3), M2 (n=3) or M3 (n=3)	<b>114</b>
<b>Figure 6</b>	Relationship between the inter-trials variability in the bacterial levels measured at the initial time of fermentation (day 0) and during the stable states	<b>116</b>
<b>Figure 7</b>	Concentrations of the fermentation products during in vitro assays with M1 (n=3), M2 (n=3) or M3 (n=3)	<b>116</b>
<b>Figure 8</b>	Composition of the fermentative medium in the different SCFA during in vitro assays with M1 (A, n=3), M2 (B, n=3) and M3 (C, n=3)	<b>117</b>
<b>Figure 9</b>	Comparison between in vivo and in vitro levels of selected bacterial populations	<b>118</b>
<b>Figure 10</b>	Comparison between in vivo and in vitro levels of fermentative metabolites	<b>119</b>
<b>Table 1</b>	Composition of the three nutritive media provided to the in vitro system	<b>108</b>
<b>Table 2</b>	Microbial groups-associated culture conditions	<b>109</b>
<b>Table 3</b>	Effect of the nutritive medium on the stabilization of the selected bacterial groups during in vitro fermentations	<b>115</b>
<b>Table 4</b>	Variability in the microbial populations levels at the initial time of fermentation and during the stabilized states, whatever the nutritive medium tested	<b>115</b>

## Chapitre III

<b>Figure 1</b>	Mode d'action d'X-TRACT™ Poultry chez les volailles	<b>131</b>
<b>Figure 2</b>	Prélèvements des échantillons jéjuno-iléaux après abattage des veaux de boucherie	<b>133</b>
<b>Figure 3</b>	Fermenteur Tryton	<b>134</b>
<b>Figure 4</b>	Evolution des groupes microbiens dénombrés dans le fermenteur Bioflo avec carvacrol ou dans le fermenteur Tryton sans carvacrol	<b>137</b>
<b>Figure 5</b>	Evolution des concentrations en métabolites fermentaires dans le fermenteur Bioflo avec carvacrol ou dans le fermenteur Tryton sans carvacrol	<b>138</b>
<b>Figure 6</b>	Évolution des pourcentages de gaz mesurés dans la phase atmosphérique des fermenteurs, dans le fermenteur Bioflo avec carvacrol et dans le fermenteur Tryton sans carvacrol	<b>139</b>
<b>Figure 7</b>	Evolution des groupes microbiens dénombrés dans le fermenteur Bioflo, sans carvacrol ou avec carvacrol, et dans le fermenteur Tryton sans carvacrol	<b>141</b>
<b>Figure 8</b>	Evolution des concentrations en métabolites fermentaires dans le fermenteur Bioflo, sans carvacrol ou avec carvacrol, et dans le fermenteur Tryton sans carvacrol	<b>142</b>
<b>Figure 9</b>	Évolution des pourcentages de gaz mesurés dans la phase atmosphérique des fermenteurs, dans le fermenteur Bioflo, sans carvacrol ou avec carvacrol, et dans le fermenteur Tryton sans carvacrol	<b>143</b>
<b>Tableau 1</b>	Composition du milieu nutritif utilisé dans le système <i>in vitro</i>	<b>133</b>
<b>Tableau 2</b>	Paramètres physiologiques des contenus jéjuno-iléaux des veaux, mesurés à l'abattage	<b>136</b>





## *AVANT-PROPOS*

Créée en 2000, l'Equipe de Recherche Technologique « Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament (ERT CIDAM) de l'Université d'Auvergne réunit les compétences technologiques de deux laboratoires de la Faculté de Pharmacie afin de répondre à des besoins spécifiques exprimés par des sociétés essaimées ou non de ces laboratoires, selon les contrats quadriennaux. Cette équipe, co-dirigée par Monique Alric, Eric Beyssac et Jean-Michel Cardot, est rattachée au Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH) d'Auvergne, ainsi qu'à l'Institut Fédératif de Recherche (IFR 79) Santé-Auvergne.

Le contrat quadriennal de 2003-2007, dans lequel s'inscrit ce doctorat, associait en partenariat deux sociétés dont la société AXISS France SAS, filiale du groupe PANCOSMA SA, fabricant d'additifs alimentaires pour l'alimentation animale. La politique de cette société est fortement orientée vers l'innovation, avec un département Recherche et Développement très actif dont les objectifs principaux sont i) l'acquisition de savoirs, ii) le développement des produits existants et la création de nouveaux produits.

En Janvier 2006, la totalité des antibiotiques utilisés en alimentation animale comme facteurs de croissance ont été interdits par la Commission Européenne, créant de ce fait un besoin pour de nouveaux additifs alimentaires permettant l'obtention de performances comparables à celles observées lors de l'utilisation d'antibiotiques. Dans ce cadre, PANCOSMA SA s'est associée avec l'un de ses plus grands clients : DENKAVIT SA, l'un des trois plus gros intégrateurs européens de la production de veaux de boucherie. Un projet de recherche « Veau de boucherie » recoupant les intérêts des deux sociétés a alors été mis en place. Les objectifs étaient i) de développer et promouvoir un des principes actifs de PANCOSMA SA (X-tract™), déjà commercialisé chez les volailles, ii) de cribler de nouveaux additifs alimentaires, iii) d'acquérir des connaissances en terme de flore intestinale. En effet, il a été montré que le mode d'action des antibiotiques facteurs de croissance était fortement lié à la microflore intestinale des animaux. La mise au point de

nouveaux additifs pouvant potentiellement remplacer les antibiotiques facteurs de croissance passe donc par l'étude de leur impact sur la microflore intestinale. Dans le but de cribler plusieurs additifs alimentaires, un système *in vitro* modélisant l'écosystème intestinal du veau de boucherie constituait un outil économique et éthique indispensable à développer. C'est pourquoi ces industriels se sont adressés à l'ERT CIDAM qui a mis en place une plate-forme technologique dans le domaine de la digestion artificielle et qui possède un savoir et un savoir-faire depuis plus de 10 ans dans le domaine de la digestion *in vitro*.

La première partie de ce mémoire présente une étude bibliographique visant à faire l'état de l'art sur i) l'utilisation des antibiotiques en tant que facteurs de croissance, la réglementation les concernant et les nouveaux additifs alimentaires susceptibles de les remplacer, ii) la microflore intestinale du veau de boucherie et les pathologies digestives associées, et enfin iii) les techniques de modélisation *in vitro* des écosystèmes intestinaux existantes à ce jour.

La seconde partie, expérimentale, décrit la mise au point d'un système de fermentation *in vitro* modélisant le contenu jéjuno-iléal du veau de boucherie, dans l'objectif d'étudier l'impact d'additifs alimentaires sur la microflore intestinale. Le premier chapitre présente la caractérisation de ce contenu intestinal, en ce qui concerne la microflore cultivable et les paramètres abiotiques, et ce, en fonction du temps de jeûne des animaux. Le second chapitre porte sur la mise au point du modèle *in vitro*, via l'étude de la microflore stabilisée dans ce système. Dans ce contexte, une étude comparative de trois milieux nutritifs différents est réalisée et les résultats sont comparés aux données obtenues *in vivo* (Chapitre I). Enfin, le dernier chapitre présente l'étude dans le modèle *in vitro* d'un additif alimentaire particulier : le carvacrol, qui constitue pour partie l'additif alimentaire X-tract™ déjà commercialisé chez PANCOSMA SA.

## ETAT DE L'ART

## CHAPITRE I :

### LE VEAU DE BOUCHERIE

---

#### I-1. Elevage du veau de boucherie

Le veau est un animal jeune, qui est élevé soit pour renouveler le troupeau, soit pour sa viande. Élevé jusqu'à 5 ou 6 mois en France, parfois jusqu'à 8 mois dans d'autres pays européens, le veau de boucherie donne une viande très appréciée du consommateur pour sa tendreté et sa couleur claire. Ses principales caractéristiques sont données dans le Tableau 1.

Comme pour toutes les femelles de mammifères, chez la vache, la naissance d'un veau est indispensable pour déclencher la production de lait. Dans les élevages laitiers, tout le lait produit par les vaches est collecté pour la consommation humaine. Par conséquent, un éleveur spécialisé dans la production de lait ne peut pas garder tous les veaux. Après leur naissance, l'éleveur laitier choisit les jeunes femelles qu'il garde pour le renouvellement de son troupeau (soit chaque année environ 20% des veaux nés sur son exploitation) et, le plus souvent, il vend les autres veaux (Figure 1). Ces derniers sont alors engraisés pour la production de viande, 70 % d'entre eux comme veaux de boucherie et 30 % pour donner de la viande rouge (jeunes bovins de boucherie, génisses, bœufs).

Les élevages spécialisés dans la production de veau de boucherie sont appelés ateliers spécialisés. Ils accueillent la grande majorité des veaux de boucherie, une très faible minorité étant engraisée dans des élevages traditionnels. De nombreux éleveurs se sont spécialisés dans ce mode d'élevage qui demande une grande technicité. Ce type d'élevage est présent sur l'ensemble du territoire national, avec une forte prédominance historique dans les bassins laitiers de l'Ouest (Normandie, Bretagne, Pays de la Loire).

Dans les ateliers spécialisés, les veaux font, le plus souvent, l'objet d'un "contrat d'intégration", défini comme un partenariat entre un éleveur et un fabricant d'aliments d'allaitement. Ce dernier, appelé aussi « intégrateur de veaux de boucherie », est

propriétaire des veaux et fournit à l'éleveur à la fois l'aliment d'allaitement (ou lactoremplacé) et le jeune veau. L'éleveur, quant à lui, fournit installations, main d'œuvre, compétences et savoir-faire afin d'élever, dans les meilleures conditions, ces veaux de boucherie [1]. C'est le cas de DENKAVIT, intégrateur de veaux de boucherie, qui fabrique de l'aliment d'allaitement.

Le veau de boucherie est une production à petit volume comparativement aux autres types d'élevage. Elle représente, en France, 1,6 millions d'animaux sur l'année 2008, c'est-à-dire 20% du nombre total de veaux nouveaux-nés (7,5 millions). En effet, 67% des jeunes veaux sont utilisés pour produire de la viande bovine adulte et 13% sont destinés à l'exportation, exclusivement européenne.

Dans l'Union Européenne, 5,6 millions de veaux de boucherie ont été produits en 2008. La France est donc le principal producteur avec 29% de la production européenne. Le poids moyen des carcasses des veaux de boucherie à l'abattage est de 120 kg [2].

Les principaux exportateurs de jeunes veaux sont l'Allemagne suivie par la Pologne avec respectivement 30 et 20% des exportations européennes (Figure 2). Les Pays-Bas sont le plus gros importateur (Figure 2), avec 53% des veaux importés en Europe. L'Italie et l'Espagne suivent avec seulement 15% des importations pour chacun des pays. La France représente une faible proportion des échanges européens, avec seulement 4,8% des exportations et 7,0% des importations. Les Pays-Bas importent beaucoup de jeunes veaux pour produire du veau de boucherie. Pourtant, ce pays n'est pas consommateur de viande de veau, il exporte 95% de sa production, principalement vers l'Italie (38%), l'Allemagne (23%) et la France (19%).

Les principaux consommateurs de viande de veau sont la France et l'Italie avec respectivement 4,1 et 3,4 kg de viande consommée par habitant et par an [3]. Elle était de 7,6 kg par habitant et par an en France en 1970 (Veissier et Lensink, 2003). Cette diminution semble provenir d'une part, du prix relatif de plus en plus élevé de la viande de veau par rapport aux autres viandes blanches, et d'autre part, de la dégradation de l'image de cette production chez les consommateurs. En effet, ceux-ci trouvent le système de production trop « industriel ».

## **I-2. Alimentation du veau de boucherie**

Chaque jour, le veau doit consommer une quantité de lait suffisante pour couvrir ses besoins de croissance. A la naissance, les veaux boivent le colostrum, c'est-à-dire le premier lait riche en anticorps maternels qui les protègent contre diverses infections. Ensuite, ils sont nourris avec un aliment d'allaitement dont la quantité apportée au veau est fonction de son poids (de 400 g à 3,5 kg par jour du début à la fin de l'engraissement) et avec une très faible quantité de fibres végétales (7% de son alimentation), apportées par du foin ou des céréales séchées dès l'âge de 3 semaines (afin de tenir compte de l'évolution physiologique de leur système digestif). Cette alimentation à base principale de produit laitier permet une production dite « de viande blanche ». En effet, le fer apporté au veau provient des produits fibreux. Aussi, le faible apport de fibres conduit à un taux de fer très bas chez le veau, limitant de façon significative l'apport de myoglobine dans les muscles, ce qui rend la viande « blanche ».

Encore appelé lactoremplacé, l'aliment d'allaitement est un aliment complet et équilibré. Mélange majoritairement composé de poudre de lait, il est dilué dans de l'eau chaude avant d'être distribué aux veaux. Dans les ateliers spécialisés, les veaux prennent leur buvée, quand ils le désirent, grâce à des distributeurs automatiques de lait, ou 2 fois par jour quand l'éleveur leur apporte le lait dans des seaux.

L'aliment d'allaitement est constitué en moyenne de 60 à 75 % de produits laitiers (poudre de lactosérum ou de lait), 16 à 22 % de matière grasse végétale ou animale, 0 à 12 % de protéines végétales, 0 à 12 % d'amidon (farine de céréales) et 1 à 3 % de complément minéral et vitaminé. Le lactosérum est la partie liquide qui se sépare du caillé lors de la coagulation du lait pendant la fabrication du fromage. En dehors de l'eau, le lactosérum contient du lactose (de 70 % à 75 %), des protéines solubles (de 10 % à 13 %, dont la principale protéine est la caséine), des vitamines (thiamine-B1, riboflavine-B2 et pyridoxine-B6) et des minéraux (essentiellement du calcium) [1].

Les poudres de lactosérum et de lait sont des sous-produits de l'industrie laitière. En effet, dans les années 1950, les producteurs de beurre et de fromage se sont retrouvés avec de grandes quantités de sous-produits de leur production, le lait écrémé et le lactosérum.

La production de veaux de boucherie a alors constitué un bon débouché pour ces surplus, d'autant plus que l'on découvre alors que les animaux engraisés de cette façon se développent bien. L'élevage industriel du veau de boucherie est alors né et, encore aujourd'hui, il constitue le prolongement de l'industrie laitière. En effet, d'une part, les jeunes veaux utilisés pour la production du veau de boucherie sont des veaux nés dans le but de provoquer la production de lait chez les vaches laitières et sont donc ainsi valorisés. D'autre part, ces animaux sont nourris avec les sous-produits de l'industrie laitière qui sont à leur tour valorisés.

### **I-3. Digestion chez le veau de boucherie**

Le veau de boucherie est un veau abattu après 5 mois d'engraissement aux lactoreplaceurs. Ces aliments liquides, additionnés d'une faible quantité de fibres dans un souci du bien-être animal, maintiennent le veau au stade pré-ruminant, c'est-à-dire avec un rumen où l'activité digestive est très faible. La caillette est alors l'estomac utilisé pour une partie de la digestion chimique des aliments.

#### I-3.1 Anatomie du système digestif

Le système gastrique du ruminant est constitué de 4 « estomacs » : le rumen, le réticulum, le feuillet et la caillette (Figure 3). Le développement des différentes parties du système digestif du veau se fait en parallèle avec l'âge et les changements alimentaires (Ruckebusch, 1977a). A la naissance, la caillette est prépondérante (2 L contre 0,75 L pour le réservoir rumino-réticulaire). Lors du développement des différents estomacs, l'accroissement de la caillette est similaire chez des veaux nourris uniquement au lait ou bien avec des aliments fibreux (Warner et al., 1956). Elle atteint 8 L à l'âge de 4 mois. Le rumen par contre change significativement selon le régime alimentaire et, avec une alimentation fibreuse, son volume est doublé comparativement à un régime lacté (Tamate et al., 1962). Ainsi, chez le veau de boucherie de 4 mois, son volume est de 15 L environ. C'est pourquoi le veau de boucherie est couramment appelé veau pré-ruminant. Sa



fonction ruminale n'est pas totalement développée et les aliments passent préférentiellement dans la caillette.

De la même façon, l'intestin va connaître une croissance importante au cours des 6 premiers mois. L'intestin grêle (Figure 4) est composé de trois segments, le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Sautet, 1995). L'intestin grêle a une longueur moyenne à la naissance de 10 m, avec un caecum de 30 cm, suivi d'un côlon de 2 m et du rectum d'environ 30 cm. L'ensemble triple sa longueur au cours des 6 premiers mois, tandis que le caecum double sa capacité. Le côlon (4 m à 3 mois) va atteindre 6 m et le rectum 85 cm à l'âge adulte.

Cette répartition des volumes des différents compartiments digestifs dans la partie anté-caecale du tractus digestif rapproche le veau pré-ruminant d'un animal monogastrique. Ce rapprochement peut aussi se faire au niveau de la physiologie de la digestion.

Le veau pré-ruminant est homéotherme. Il est capable dès la naissance de maintenir sa température corporelle entre 38,3 et 38,7° C (Ruckebusch, 1977b).

Chez le veau pré-ruminant, le pH duodéal varie entre 2,5 et 5,5, il augmente progressivement jusqu'à l'iléon distal où il est compris entre 7,0 et 8,0. Cette alcalinisation due aux sécrétions biliaires est nécessaire pour l'activation des enzymes pancréatiques et intestinales qui ont généralement un pH optimum d'activité neutre ou légèrement alcalin (Sautet, 1995).

Pendant les 5 à 8 premières heures après ingestion de l'aliment, le déplacement des aliments dans l'intestin grêle du veau est assuré par la propagation d'ondes propulsives, dont la vitesse est d'environ 6,6 cm/s (Ruckebusch, 1977a).

### I-3.2 Digestion des aliments

Chez le veau de boucherie, les aliments passent d'abord par la caillette avant de passer dans l'intestin grêle. La digestion des nutriments se fait donc en deux parties.

### *I-3.2.2 Digestion des protéines*

L'apport protéique de l'aliment d'allaitement est principalement représenté par les caséines du lactosérum. Les matières azotées sont digérées par des enzymes protéolytiques, dans la caillette et dans l'intestin. Dans la caillette, sous l'action d'acide chlorhydrique, de chymotrypsine et de pepsine, le lait coagule très rapidement, formant un réseau qui retient les caséines et les lipides. Les protéines sont en grande partie hydrolysées en peptides, qui vont passer dans l'intestin grêle avec les protéines non-hydrolysées (Toullec et al., 2003). Les enzymes complétant la digestion des protéines dans l'intestin proviennent du suc pancréatique (trypsine, chymotrypsine...). L'hydrolyse des protéines dans la lumière intestinale, aboutit à la formation d'un mélange comprenant environ 70 % de petits peptides (de 2 à 6 acides aminés) et 30 % d'acides aminés libres. L'hydrolyse des petits peptides se poursuit en partie ensuite au contact des entérocytes (Toullec et Lalles, 1995). Les acides aminés libres, dipeptides et tripeptides issus de la protéolyse sont absorbés par la muqueuse de l'intestin grêle, se retrouvent dans le système sanguin et sont transportés vers le foie (Figure 5).

La digestibilité des protéines dépend à la fois de l'âge des veaux et des traitements technologiques appliqués à l'aliment. Cependant, la digestibilité des protéines du lait est toujours très élevée : 97% (Thivend et Toullec, 1977).

### *I-3.2.3 Digestion des glucides*

Le lactose est le constituant glucidique majeur (30 à 45% de la matière sèche) du lait ou des aliments d'allaitement. On retrouve de faibles quantités de saccharose, d'amidon et d'autres glucides complexes si l'on utilise des produits d'origine végétale comme le soja. La digestion des glucides se fait dans l'intestin grêle, grâce à l'amylase et à la maltase pancréatiques, ainsi qu'à la lactase, l'amylase, la maltase et l'isomaltase intestinales (Toullec et al., 2003).

Les produits terminaux de la digestion des glucides sont essentiellement des oses. Les oses libérés par l'hydrolyse enzymatique du lactose (glucose et galactose), sont absorbés très rapidement dans le sang (Figure 5), avec un pic de glycémie 3h après ingestion

(Thivend et Toullec, 1977). Les glucides complexes, issus des fibres de l'alimentation des veaux, ne sont pas forcément hydrolysés par les enzymes pancréatiques et intestinales et arrivent dans le côlon pour être fermentés par la microflore colique en acides gras à chaîne courte (AGCC).

Le lactose a une digestibilité très élevée (99%). La digestibilité de l'amidon augmente en fonction de l'âge du veau et du traitement technologique de l'aliment (Toullec et al., 2003).

#### *I-3.2.4 Digestion des lipides*

Des matières grasses d'origine végétale ou animale (essentiellement des triglycérides) sont ajoutées à l'aliment d'allaitement. Ces lipides se lient aux protéines de l'aliment et forment des globules gras (Toullec et al., 2003).

Dès leur passage dans la caillette, les triglycérides subissent une hydrolyse partielle sous l'action de la lipase salivaire. Cette hydrolyse est facilitée par la coagulation de l'aliment d'allaitement, permettant la rétention des produits lipidiques dans la caillette. Plus de 65% des acides gras courts et moyens (C4 à C8) sont libérés des globules gras et absorbés dans la caillette. Environ 25% des acides gras longs sont libérés mais leur absorption n'a lieu que dans l'intestin grêle (Figure 5).

La digestion des matières grasses dans l'intestin est réalisée dans le duodénum sous l'action du complexe lipase-colipase pancréatique, en présence des émulsifiants tels que les sels biliaires et les phospholipides apportés par la bile (Guilloteau et al., 1995). Cette lipolyse entraîne la libération exclusive d'acides gras libres et de monoglycérides. Ceux-ci forment des micelles avec les sels biliaires et les phospholipides afin d'être absorbés dans le jéjunum. Les sels biliaires sont eux absorbés au niveau de l'iléon. L'intestin réestérifie les acides gras sous forme de triglycérides et de phospholipides et d'esters de cholestérol et les sécrète préférentiellement dans le système lymphatique sous la forme de chylomicrons et de lipoprotéines de faible densité (VLDL) et secondairement de lipoprotéines de haute densité (HDL). Cependant, pendant les pics d'absorption des lipides alimentaires, la moitié

des chylomicrons et des VLDL est sécrétée directement dans la veine porte, accédant directement au foie (Durand et al., 1990).

Plus l'acide gras est long et saturé, moins il sera digestible. Cette digestibilité dépend aussi de la technique d'incorporation de l'acide gras dans le lactoremplacéur qui définit ensuite la taille des globules gras formés : plus les globules gras sont volumineux, moins la lipase salivaire aura de sites de fixation et moins les acides gras pourront être libérés (Toullec et al., 2003).

#### *I-3.2.5 Absorption des micronutriments*

L'absorption du fer va se faire dans le duodénum, quelle que soit sa forme chimique. Dans le jéjunum, on trouve les sites d'absorption du calcium et du potassium. Dans l'iléon, il y a essentiellement absorption du phosphore, de l'iode, du zinc et de la vitamine B<sub>12</sub>. Magnésium, chlore et sodium ne sont pas absorbés dans l'intestin grêle et passent dans le côlon où leur absorption est importante (Thivend et Toullec, 1977).

Le veau de boucherie a des caractéristiques propres, en particulier concernant sa physiologie et son anatomie digestives. En effet, l'apport quasiment exclusif d'aliment d'allaitement pendant toute la période d'engraissement de l'animal modifie le cours normal du développement de l'animal. Le veau de boucherie est donc considéré comme un pré-ruminant puisque son rumen n'est pas totalement fonctionnel.

## CHAPITRE II :

### LES ANTIBIOTIQUES FACTEURS DE CROISSANCE

---

#### II-1. Utilisation des antibiotiques facteurs de croissance

L'utilisation des antibiotiques en tant que facteurs de croissance (AFCs) chez les animaux d'élevage a débuté dans les années 1940. Peu après l'introduction des antibiotiques à usage thérapeutique, l'effet promoteur de croissance de ces produits a été découvert chez les poulets. En effet, lors d'études ayant pour objectif de stériliser le tractus gastrointestinal des poulets avec des antibiotiques comme les sulfonamides et la streptomycine, un effet promoteur de croissance a été observé (Moore et al., 1946), effet confirmé peu après chez les porcs (Luecke, 1950). De plus, lorsque des porcs furent nourris avec des déchets fermentaires de la production d'oxytétracycline par *Streptomyces aureofaciens*, leur croissance s'est vue augmentée (Jukes et al., 1956 ; Jukes et al., 1950). L'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (United States Food and Drug Administration) approuva l'utilisation des antibiotiques comme additifs alimentaires sans prescription vétérinaire en 1951 (Jones et Ricke, 2003). De plus, au cours des années 1950 et 1960, chaque état européen autorisa l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance. A partir de cette époque, l'utilisation de plusieurs antibiotiques comme promoteurs de croissance est devenue courante en production animale, en particulier dans les élevages intensifs. La majorité des antibiotiques ayant été utilisés comme facteurs de croissance est présentée dans le tableau 2. Le dernier antibiotique autorisé pour l'engraissement des veaux de boucherie était le monensine-sodium, de la famille des polyéthers ionophores.

## **II-2. Mode d'action**

D'après l'Office National de Santé Vétérinaire de Londres, les AFCs sont utilisés pour aider les animaux en cours de croissance à digérer leur nourriture de façon plus efficace, à en tirer le maximum de bénéfices et à rester en pleine santé (House-of-Lords, 1998). Ce ne sont pas des stimulateurs d'appétit.

Les AFCs, utilisés à des concentrations largement inférieures à celles utilisées en thérapeutique, permettent une digestion des nutriments plus efficace, diminuant ainsi la quantité d'aliment nécessaire à l'engraissement des animaux (Samanidou et Evaggelopoulou, 2008). Ceci constitue la principale raison pour laquelle les AFCs ont été largement utilisés en élevage intensif. De plus, l'efficacité des AFCs est d'autant plus importante dans des conditions où le risque d'infection est plus élevé, à des âges particuliers, lors d'un changement d'alimentation ou encore dans certaines conditions d'élevage peu hygiéniques (Page, 2006).

Le mode d'action des antibiotiques comme facteurs de croissance n'est pas encore précisément connu à ce jour. Ils affecteraient l'activité métabolique de certains microorganismes intestinaux, ou entraîneraient un changement de l'équilibre de l'écosystème intestinal (Samanidou et Evaggelopoulou, 2008). Cette hypothèse repose sur le fait que la microflore intestinale aurait un impact négatif sur la croissance animale, directement ou indirectement, et que le mécanisme des AFCs dépendrait de leurs propriétés antibactériennes. De plus, le fait que les AFCs n'aient pas d'effet chez des poulets axéniques conforte cette idée (Coates et al., 1963). Collier et al. (2003) ont également montré en 2003 que des traitements aux AFCs entraînaient une réduction de la diversité des espèces ainsi qu'une réduction du nombre total de bactéries de la microflore intestinale de porcs castrés.

Cinq hypothèses ont été proposées afin d'expliquer l'action des AFCs (Figure 6, Dibner et Richards, 2005 ; Niewold, 2007 ; Page, 2006 ; Samanidou et Evaggelopoulou, 2008).

### II-2.1 Diminution de la prévalence des infections endémiques sub-cliniques

Les AFCs inhiberaient les infections endémiques sub-cliniques et réduiraient ainsi les coûts métaboliques du système immunitaire. En effet, les antibiotiques promoteurs de croissance agiraient probablement en inhibant certaines bactéries pathogènes dans l'intestin des animaux. Ces bactéries ne provoqueraient pas forcément de maladie apparente, mais simplement un ralentissement de la croissance. Il a en effet été démontré que les AFCs sont plus efficaces dans de mauvaises conditions d'hygiène. Par exemple, pour l'élevage de poulet, il est établi que la croissance des animaux est meilleure dans un bâtiment d'élevage neuf ou très propre que dans un bâtiment ancien non nettoyé et donc source d'infections et il a été montré que l'administration d'antibiotiques à faible dose restaure la croissance optimale des poulets des bâtiments considérés « sales » (Coates et Fuller, 1977 ; Fuller et al., 1979). L'équipe de Fuller a aussi démontré ce type de mécanisme chez le poulet où le pathogène *Streptococcus faecium* provoque une dépression de croissance transitoire, laquelle est annulée par apport de suppléments de pénicilline (Fuller et al., 1984 ; Fuller et al., 1983 ; Houghton et al., 1981).

Les additifs antibiotiques peuvent aussi contrôler de réelles pathologies intestinales, même aux faibles doses utilisées (20-60 ppm). Ainsi, l'entérite nécrosante des volailles due à *Clostridium perfringens* est réprimée par la pénicilline à faible dose (Powell et al., 1974), et par l'avoparcine, l'avilamycine, et le monensine (Elwinger et al., 1998). *Cl. perfringens* de type A provoque aussi une diarrhée qui diminue la croissance des porcelets. Un aliment supplémenté par 30 ppm de salinomycine prévient cette diarrhée (Kyriakis et al., 1995). Enfin, l'utilisation des additifs antibiotiques prévient chez le porc la dysenterie due à *Serpulina hyodysenteriae*, comme l'ont appris à leurs dépens les éleveurs Suédois, au moment de l'interdiction des additifs antibiotiques.

Cependant, certains auteurs comme Niewold n'adhèrent pas à l'hypothèse d'un effet direct des AFCs sur la microflore, ils pensent que les AFCs ne peuvent pas inhiber les infections sub-cliniques dans la mesure où ils sont utilisés à des concentrations inférieures au MIC (Minimum Inhibitory Effect i.e. concentration minimale ayant un effet inhibiteur).

### II-2.2 Réduction de la production de métabolites toxiques

Les AFCs réduiraient la production microbienne de métabolites toxiques et réduiraient de ce fait les coûts énergétiques engendrés par la détoxification de l'organisme. En effet, les uréases bactériennes libèrent dans l'intestin de l'ammoniaque (Okumura et al., 1976), toxique pour les cellules de la muqueuse et pour l'organisme (Vissek, 1978a). Le foie détoxifie l'ammoniaque en synthétisant de l'urée. Ce cycle est coûteux en énergie. Vissek a démontré *in vitro* et *in vivo* que les antibiotiques à faible dose inhibent fortement les uréases bactériennes, et donc le catabolisme de l'urée (or, il n'y a pas d'uréase chez les mammifères). Vissek a également montré qu'une inhibition de l'uréase améliorait la croissance des animaux autant que l'antibiosupplémentation (Vissek, 1964, 1978b). Les antibiotiques à faible dose inhibent également le catabolisme des acides aminés par les bactéries. On a pu démontrer, sur des souches pures ou sur des microflore complexes prélevées dans le caecum de porc, que de faibles doses d'antibiotiques inhibaient les désaminases, productrices d'amines, composés toxiques. Il a notamment été observé que les antibiotiques les plus efficaces pour inhiber le catabolisme de l'arginine par du contenu cæcal de porc étaient également les plus efficaces sur les performances zootechniques du porc (Michel et al., 1955). Ces résultats ont depuis été retrouvés *in vivo*, dans le jéjunum ou le cæcum de porcs anesthésiés (Dierick et al., 1986a, 1986b).

### II-2.3 Augmentation de la disponibilité des nutriments pour l'hôte

Les AFCs réduiraient l'utilisation microbienne des nutriments entraînant une proportion plus importante disponible pour l'animal. En effet, il est estimé que 6 % de l'énergie nette de l'alimentation des porcs est « perdue » à cause de la fermentation microbienne intestinale (Samanidou et Evaggelopoulou, 2008). Tous les mécanismes cités ci-dessus démontrent que les AFCs diminuent le catabolisme, et donc l'utilisation des nutriments par les bactéries. Les antibiotiques augmentent donc la disponibilité des nutriments et de l'énergie pour l'animal (Vervaeke et al., 1978, 1979). Cet effet d'épargne est particulièrement net pour les acides aminés et se traduit par une amélioration de la rétention azotée (Dierick et al., 1978 ; Rerat, 1965). De plus, les antibiotiques à faible dose



peuvent aussi inhiber dans l'intestin la fermentation des glucides, notamment la production d'acide lactique à partir du glucose (Nagaraja et al., 1987), laissant donc plus de glucose disponible pour l'animal.

Enfin, l'abaissement des concentrations intestinales d'ammoniaque et d'amines diminue le taux de renouvellement de l'épithélium intestinal (Vissek, 1978a). Cette moindre prolifération épargne les nutriments nécessaires à la synthèse des protéines, des acides nucléiques et des lipides membranaires des cellules intestinales desquamées (Vissek, 1978b).

#### II-2.4 Amélioration de l'absorption intestinale

Les AFCs entraîneraient une diminution de l'épaisseur de la paroi intestinale et amélioreraient donc l'absorption et l'utilisation des nutriments pour l'animal. En effet, certains travaux montrent que l'absorption des nutriments est améliorée chez les animaux recevant des antibiotiques comme facteurs de croissance (Decuypere et al., 1991). Ceci serait dû i) à l'augmentation de la surface d'absorption intestinale, ii) à la diminution de l'épaisseur de la muqueuse et iii) à la diminution de la vitesse du transit digestif. Les changements d'épaisseur résulteraient de la diminution de la prolifération de la muqueuse. Le ralentissement du transit digestif serait lié à la diminution de la concentration en acide lactique dans le contenu intestinal (Decuypere et al., 1991).

#### II-2.5 Inhibition de la réponse inflammatoire

Niewold (2007) ne croit pas que les AFCs agissent sur la microflore, ni que leur action est liée à leurs propriétés antibactériennes. En effet, tous les antibiotiques n'ont pas un effet promoteur de croissance alors qu'ils devraient tous avoir un effet sur le microbiote intestinal en tant qu'antibiotique. En outre, différentes classes d'antibiotiques ayant une action ciblée sur un type de microorganisme précis sont utilisés en tant qu'AFCs (voir Tableau 2) et ils ont tous le même effet de promotion de la croissance. Enfin, certains sont

également utilisés chez une grande variété d'espèces animales ayant des microflore intestinales différentes et ils ont un effet similaire chez tous ces animaux.

La théorie de Niewold repose sur un effet anti-inflammatoire des antibiotiques. Les AFCs seraient capables de s'accumuler dans les cellules inflammatoires pour atteindre des concentrations entre 10 et 100 fois supérieures à celles observées dans la lumière intestinale, entraînant alors une inhibition de la réponse inflammatoire. Cette inhibition entraînerait une diminution du nombre de cellules inflammatoires dans la muqueuse. Ce changement serait alors la cause de la réduction de l'épaisseur de la paroi intestinale et du ralentissement du catabolisme musculaire, permettant alors une meilleure utilisation de l'énergie fournie par les aliments. La modification du microbiote intestinal observée lors de l'utilisation des AFCs serait donc une conséquence de l'altération du statut immunitaire des animaux et non un effet direct des AFCs. Cette hypothèse est cependant beaucoup moins confirmée par la communauté scientifique que celle impliquant le microbiote intestinal.

### **II-3. Implication des AFCs dans l'apparition de résistances bactériennes aux antibiotiques**

Beaucoup d'AFCs sont proches de ou identiques aux antibiotiques utilisés en médecine humaine, comme les  $\beta$ -lactames, les tétracyclines, les sulphonamides, les macrolides, les lincosamides et les quinolones (Samanidou et Evaggelopoulou, 2008). Malgré tous les avantages apportés par les AFCs à l'industrie de production animale, en termes de santé, mais aussi d'économie, une conséquence inquiétante de l'utilisation de ces produits est apparue, dès les années 1950. En effet, l'utilisation d'antibiotiques, à but thérapeutique, prophylactique ou en tant qu'additifs alimentaires, dans les différents écosystèmes (animaux, hommes) a conduit à la sélection de souches bactériennes résistantes, par élimination des souches sensibles (Davies, 1994 ; Levy, 1994). Ces souches résistantes apparaissent suite à des mutations dans leur ADN, leur conférant un gène de résistance. L'émergence de ces résistances est observée quel que soit l'antibiotique utilisé et quels que soient le mécanisme biochimique et le support génétique de la résistance

(Bories et Louisot, 1998). Le transfert de ces résistances, des bactéries commensales ou bactéries pathogènes entraîne alors un problème sanitaire important. Bien que les antibiotiques utilisés en tant qu'additifs aient un pouvoir sélectionnant faible comparativement à certains antibiotiques utilisés en thérapeutique, il est prouvé que des réservoirs de résistance se constituent là où les antibiotiques sont utilisés en quantité importante et/ou en quantité plus faible mais de façon prolongée. Une des premières observations de l'apparition de résistance bactérienne due à un AFC chez les animaux d'élevage a été mise en évidence en 1951 par Starr et Reynolds après un essai expérimental chez des dindes dont l'alimentation était additionnée de streptomycine. D'autres chercheurs (Barnes, 1958 ; Elliott et Barnes, 1959) ont rapporté une association entre la résistance bactérienne à la tétracycline et l'apport d'antibiotiques facteurs de croissance chez les poulets. Par la suite, cette association a été démontrée pour plusieurs autres antibiotiques : les macrolides (tylosine and spiramycine), l'avilamycine, la virginiamycine et la bacitracine (Aarestrup et al., 2000). Un exemple a été étudié plus en détails, celui des *Enterococcus faecium* glycolipide-résistants (GREF). Ces GREF ont tout d'abord été isolés dans les fèces de porcs et de poulets issus d'élevages utilisant de l'avoparcine, alors que l'espèce résistante n'était pas ou peu présente dans les élevages n'utilisant pas cet AFC (Klare et al., 1995b). Cette observation a démontré que l'utilisation de l'avoparcine (de type glycolipide) en tant qu'additif alimentaire entraîne la création d'un réservoir de GREF dans les élevages. De plus, la présence de GREF dans les carcasses de volailles et dans la viande de porc a démontré la possibilité de contamination des viandes à destination de l'alimentation humaine (Chadwick et al., 1996 ; Klare et al., 1995a ; Klare et al., 1995b). La transmission des GREF résistants aux humains a été confirmée (Klare et al., 1995a ; Schouten et Voss, 1997). Des résultats similaires ont été obtenus pour d'autres AFCs comme la virginiamycine avec les Entérocoques (DANMAP, 1998 ; Welton et al., 1998 ; Werner et al., 2000 ; Werner et al., 1998), ou la bacitracine avec les Streptocoques, les Enterocoques et les Staphylocoques (Everett et al., 1995 ; Stuart et Ferretti, 1978). Ces études démontrent bien toute l'importance de contrôler l'apparition de résistances

bactériennes chez l'animal afin de limiter ensuite le transfert de ces résistances chez l'homme (Witte et al., 1999).

## **II-4. Evolution de la réglementation**

La prise de conscience de l'impact du développement de résistances chez les pathogènes de l'homme a eu lieu dès 1969 grâce au rapport de Swann au parlement britannique (Swann-Committee, 1969). Ce rapport proposait des recommandations pour l'utilisation des AFCs afin de limiter les risques pour l'homme. L'utilisation des AFCs a ainsi été restreinte aux antibiotiques i) entraînant un impact économique significatif dans les élevages ; ii) n'ayant pas ou peu d'application comme agents thérapeutiques, chez l'homme comme chez l'animal ; iii) n'affaiblissant pas l'efficacité des médicaments thérapeutiques via le développement de souches résistantes (Butaye et al., 2003). Ces critères furent ensuite repris par l'Union Européenne pour les protocoles d'obtention des autorisations de commercialisation des AFCs (Helmut et Bulling, 1985). Ainsi, les antibiotiques à large spectre n'ont plus été utilisés et à partir des années 1970, seuls les AFCs ayant un spectre d'activité envers les bactéries Gram-positives étaient autorisés. La totalité des AFC n'a pas été interdite à ce moment là car le possible transfert à l'homme des germes résistants à ces produits n'était pas démontré. La Suède avait cependant interdit l'utilisation de tout antibiotique comme additif alimentaire dans l'alimentation humaine ou animale dès 1986. La position politique européenne a changé lors de la découverte du transfert des GREF en 1993. Depuis cette date, un grand nombre d'interdictions, nationales ou européennes ont été mises en place. L'avoparcine a été interdite au Danemark (1995) et en Allemagne (1996). La spiramycine a été interdite en Finlande et la virginiamycine au Danemark (1998). A la suite de ces initiatives nationales, la directive européenne 97/6 annula l'autorisation d'utilisation de l'avoparcine en 1997 et la directive 2821/1998 interdit la spiramycine, la virginiamycine et la bacitracine en 1999. Début 2006, la totalité des antibiotiques fut interdite en Europe pour l'utilisation en tant qu'additif alimentaire par la loi 1831/2003 (The-European-parliament-and-the-council, 2003), leur utilisation étant alors réservée à un usage thérapeutique.

## **II-5. Conséquences des réglementations**

### II-5.1 Conséquences sur la résistance antibactérienne

Les principales conséquences présagées de l'interdiction des AFCs étaient la réduction globale de la quantité d'antibiotiques utilisés, et donc la diminution du risque de transfert à l'homme de germes résistants. Les scientifiques ne s'accordent cependant pas vraiment sur l'apport bénéfique de cette interdiction (Collignon, 2004 ; Hammerum et al., 2007 ; Phillips, 2007). Les données disponibles suggèrent que l'interdiction des AFCs a entraîné un accroissement des infections chez l'animal et donc une intensification de l'utilisation des antibiotiques à usage thérapeutique, permettant tout de même une diminution de l'usage global (Casewell et al., 2003). Quand la tetracycline a été interdite en Europe dans les années 1970, certaines études ont montré une diminution des niveaux de résistance chez l'animal (van Leeuwen et al., 1979) alors que d'autres n'ont montré aucun changement (Sorensen, 1979). L'évolution des résistances dans le réservoir animal a, par la suite, été plus étudiée pour les Entérocoques. Les études ont montré une réduction du nombre d'entérocoques résistants aux glycopeptides, aux macrolides et à l'evernimycine après l'interdiction de l'avoparcine, de la virginimycine, de la tylosine, de la spiramycine et de l'avilamycine (Figure 7, Aarestrup et al., 2001 ; Bager et al., 1999 ; Boerlin et al., 2001 ; Klare et al., 1999). Un exemple intéressant de co-sélection a été observé au Danemark. Quand l'avoparcine a été interdite, les niveaux de GREF dans les élevages porcins n'ont pas diminué. Cependant, après l'interdiction des macrolides, ces niveaux ont baissé de façon significative. Ceci s'explique par l'existence d'un lien génétique entre les deux gènes de résistance aux deux antibiotiques chez les souches d'origine porcine (Aarestrup, 2000 ; Boerlin et al., 2001).

La réduction des résistances bactériennes dues aux AFCs a également été montrée dans les viandes (Del Grosso et al., 2000 ; Emborg et al., 2003). Cette régression a été corrélée avec une baisse de la contamination aux GREF des hommes, dans au moins 3 pays : l'Allemagne, les Pays-Bas et la Belgique (Figure 8, Bruinsma et al., 2003 ; Klare et al., 1999 ; van den Bogaard et al., 2000 ; Witte, 1997).

Ces diminutions n'ont cependant pas mené à une complète disparition des souches résistantes. Plusieurs études ont démontré que même si la probabilité de trouver une souche résistante a diminué, ces souches sont toujours présentes dans l'environnement agricole, dans le réservoir animal et même dans les aliments (Borgen et al., 2000 ; Borgen et al., 2001 ; Heuer et al., 2002).

#### II-5.2 Conséquences sur les performances et la santé des animaux

L'interdiction des AFCs a engendré une détérioration de la production et de la santé animales. En effet, en Suède, la diminution des performances de production des porcs observée suite à l'interdiction totale des AFCs en 1986 n'était toujours pas tout à fait contrée 15 ans plus tard (Wierup, 2001). Au Danemark, une augmentation des maladies et de la mortalité des porcs a été rapportée (Wegener, 2002), majoritairement associée à des infections entériques (Verner Wheelogk et Foster, 2002). Onze % des troupeaux de porcs connaissent des problèmes permanents avec une multiplication des diarrhées ou un gain de poids diminué (Callesen, 2002). Une baisse de la prise de poids et une recrudescence de la mortalité des porcelets ont également été observées au Danemark et en Espagne après l'interdiction des AFCs (Callesen, 2002 ; Verner Wheelogk et Foster, 2002). Le Département National Danois de la Production de Volailles a rapporté que, jusqu'à la fin des années 1990, l'industrie du poulet a lutté contre des problèmes de peau et de pattes, et que l'interdiction des AFCs avait joué un rôle majeur dans le développement de ces maladies (Petersen, 2002).

Des solutions de remplacement des AFCs sont donc nécessaires afin de permettre aux éleveurs de retrouver les performances de croissance de leurs animaux tout en limitant les pathologies gastro-intestinales dont la fréquence s'est accrue depuis l'interdiction des AFCs.

## **II-6. Candidats au remplacement des AFCs**

Les additifs pouvant potentiellement remplacer les AFCs doivent obéir aux conditions de la réglementation EC 1831/2003 (The-European-parliament-and-the-council, 2003), qui a pour but de garantir l'innocuité des produits vis-à-vis de la santé humaine et animale. Les additifs alimentaires sont définis comme des substances, microorganismes ou préparations, autres que la nourriture elle-même, qui sont additionnés intentionnellement à l'eau ou aux aliments dans l'objectif d'accomplir une ou plusieurs des fonctions suivantes.

Les additifs alimentaires doivent :

- i) affecter favorablement les caractéristiques de l'aliment ;
- ii) affecter favorablement les caractéristiques des produits animaux ;
- iii) affecter favorablement les couleurs des poissons et oiseaux ornementaux ;
- iv) satisfaire les besoins nutritionnels des animaux ;
- v) affecter favorablement les conséquences environnementales de la production animale ;
- vi) affecter favorablement la production animale, en termes de performances et de bien-être, particulièrement en affectant la flore gastro-intestinale ou la digestibilité des composants de l'aliment ;
- vii) avoir un effet coccidiostatique ou histomonostatique.

Cependant, les additifs ne doivent pas :

- i) avoir un effet inverse sur la santé animale, humaine ou sur l'environnement ;
- ii) être présentés d'une manière pouvant induire en erreur l'utilisateur ;
- iii) nuire au consommateur en détériorant les caractéristiques distinctives des produits animaux ou induire en erreur le consommateur concernant les caractéristiques distinctives des produits animaux.

Les différents produits proposés par les scientifiques et les industriels de l'alimentation animale appartiennent à des familles très différentes (Tableau 3). Certains de ces produits sont déjà commercialisés (Enteroguard, X-tract<sup>TM</sup>, ...). En général, ces produits permettent une amélioration des performances de croissance mais leur mode d'action n'est pas encore précisément connu. Beaucoup d'études ont été réalisées chez le porc et la volaille qui sont des élevages à gros volume de production. Comparativement, le veau de boucherie représente un très petit volume de production et un intérêt moindre lui a été porté.

#### II-6.1 Oligo-éléments

Le cuivre et le zinc ont des effets reconnus sur les performances de croissance des animaux. Une étude de l'Institut Technique du Porc (ITP) a montré que, chez les porcs, un apport en sulfate de cuivre de 90 à 250 mg/kg d'aliment permet une amélioration du gain moyen quotidien (GMQ) de 12,3 % (en moyenne) et de l'indice de consommation (IC) de 4,8 % (Royer et al., 2001). Avec un ajout d'oxyde de zinc (2000 à 3000 mg/kg d'aliment) les mêmes paramètres sont améliorés chez 11 porcs sur 13 avec une augmentation du GMQ de 9,3 % et de l'IC de 2,6 %. Cependant, une telle dose de zinc est toujours actuellement interdite en Europe. Quant au cuivre, le risque d'une accumulation future de cet oligo-élément dans les sols suite à l'épandage répété de lisiers en contenant des teneurs élevées conduit les autorités de l'UE à examiner actuellement une diminution de la teneur maximale autorisée, teneur qui ne serait alors plus efficace sur les performances de croissance.

#### II-6.2 Enzymes

L'incorporation d'enzymes digestives dans les aliments vise à renforcer la digestibilité de certains constituants des matières premières, en particulier les polysaccharides. Les enzymes permettraient également de limiter les effets négatifs de certains facteurs anti-nutritionnels et de réduire les diarrhées. L'étude de l'ITP a montré



une amélioration du GMQ de 2,8 % et de l'IC de 1,8 % lors de l'apport d'enzymes à des porcelets en post-sevrage (Royer et al., 2001).

### II-6.3 Acidifiants

Les acides organiques et leurs sels, regroupés sous le nom d'acidifiants, possèdent des avantages zootechniques et sanitaires substantiels : un excellent pouvoir bactéricide, une régulation de la flore digestive, une forte appétence et un pouvoir d'activation des enzymes digestives. Ainsi, les performances de croissance progressent et parallèlement, les troubles digestifs régressent. L'apport d'acidifiants dans l'alimentation aide à maintenir un pH bas dans l'estomac et l'intestin, favorisant ainsi l'activation des enzymes protéolytiques et augmentant le temps de rétention gastrique (Partanen et Mroz, 1999). Ils favorisent également la flore acidophile. L'emploi d'acide butyrique à 0,4 % dans l'alimentation de poulets a permis une amélioration de la conversion alimentaire de 8 % (Leeson et al., 2005). Manzanilla et al. (2006) ont démontré que le butyrate de sodium permet d'atteindre les mêmes performances de croissance que celles observées avec l'avilamycine (AFC) chez des porcelets en sevrage.

Piva et al. (2008) ont étudié l'effet de la synergie entre un substrat fermentescible (le lactilol) et un précurseur de l'acide butyrique (la tributyrine) sur les performances de croissance et le développement histologique de la muqueuse intestinale de porcelets. Comparativement au régime standard européen, cet apport a engendré une prise de poids des animaux plus importante ainsi que l'allongement des villosités et le rétrécissement des cryptes de la paroi du jéjunum, conduisant à une meilleure absorption des nutriments.

### II-6.4 Prébiotiques

Un prébiotique est un ingrédient alimentaire non digestible qui exerce une action bénéfique sur la santé en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité métabolique d'un nombre limité de microorganismes de l'intestin (Gibson et Roberfroid, 1995). L'apport de substrats spécifiques favorise le développement de groupes bactériens

favorables à l'hôte (classiquement les Lactobacilles et les Bifidobactéries), empêchant ainsi la prolifération d'espèces pathogènes.

Les oligo-saccharides constituent la catégorie la plus importante des prébiotiques, les principaux étant les fructo-oligosaccharides (FOS), les gluco-oligosaccharides (GOS), les mannan-oligosaccharides (MOS) et les galacto-oligosaccharides (GAS). Leur inclusion dans l'alimentation se fait à de faibles concentrations (0,1 à 0,3 %) et permet l'amélioration du GMQ, de la conversion alimentaire et du statut sanitaire des animaux (Piva et Rossi, 1999).

Baurhoo et al. (2007) ont démontré que l'apport de MOS (0,2 %) chez des poulets entraîne une augmentation, dans leur contenu caecal, de la concentration en Lactobacilles de 0,8 logs (UFC/mL) et en Bifidobactéries de 0,6 logs, comparativement à un régime contrôle avec AFC (virginiamycine). L'apport de GOS (20 g/kg d'aliment), comparativement à un régime sans additif, engendre aussi des modifications (Piva et Rossi, 1999) dans le profil des AGCC produits (réduction des pourcentages en acides butyrique, isobutyrique et isovalérique et augmentation du pourcentage en acide caproïque), ainsi que dans la production des gaz de fermentation (teneurs en H<sub>2</sub> et en CH<sub>4</sub> produits multipliées par 2 et 3, respectivement).

De plus, l'apport de prébiotiques limite la prolifération des espèces pathogènes. Il a été montré que lors de l'ajout de MOS dans le régime alimentaire des porcs, une compétition se mettait en place entre les MOS et les déterminants antigéniques de certains pathogènes contenant des résidus mannanes, pour les récepteurs cellulaires de la paroi intestinale. Ceci limite alors la possibilité de fixation des pathogènes à la paroi intestinale et donc leur développement (Castro et al., 1994 ; De Ruiter et al., 1994).

Divers prébiotiques ont été testés chez le veau. Les performances de croissance des veaux ont été améliorées par l'ajout de galactosyl-lactose (GAS), qui a également permis de réduire la sévérité des diarrhées des animaux (Quigley et al., 1997). L'apport de fluide ruminal, préalablement autoclavé, centrifugé et resuspendu à 50% dans du sérum physiologique, a été testé dans l'aliment d'allaitement des veaux, pendant 6 semaines, au

taux de 8 mL par jour (Muscato et al., 2002). Cet apport a permis une diminution de la prévalence des diarrhées de 40% pendant les deux premières semaines, 75% pendant les 2 suivantes et 100% pendant les 2 dernières. Ceci est dû à la présence d'un polysaccharide bactérien dans le fluide ruminal, possédant des propriétés antigéniques en compétition avec les antigènes des pathogènes pour les récepteurs de la muqueuse, empêchant l'adhésion de ces derniers. L'addition de plasma séché par sprayage, d'origine bovine ou porcine, dans l'aliment de veaux de 5 jours et ce, pendant 42 jours (Quigley et Wolfe, 2003), a entraîné une réduction de la mortalité de 70 % et une régression de 30 % de la morbidité (nombre de jours pendant lesquels les veaux avaient la diarrhée, sur la durée totale d'expérimentation). Enfin, l'ajout de MOS (4g/jour) dans l'alimentation de veaux de leur naissance jusqu'à l'âge de 6 semaines, a également conduit à une augmentation de 10% de la consommation alimentaire et à une diminution de 20% de l'apparition des diarrhées, comparativement à un régime sans additif alimentaire (Heinrichs et al., 2003).

#### II-6.5 Probiotiques

Les probiotiques sont des préparations de microorganismes sélectionnés (bactéries ou levures) apportées régulièrement et en quantité élevée dans le régime des animaux afin d'influencer favorablement la microflore digestive. Il y a 3 grandes catégories de microorganismes considérés comme des probiotiques à ce jour (Stein et Kil, 2006) : les *Bacillus* (bactéries sporulantes gram-positives), les bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus*) et les levures. Afin que les probiotiques aient un impact positif sur l'animal, plusieurs points doivent être contrôlés : i) les microorganismes doivent avoir un taux de croissance élevé dans l'environnement digestif ; ii) les microorganismes doivent produire des métabolites ayant un effet suppresseur sur les pathogènes ; iii) les microorganismes doivent être capables de survivre dans l'alimentation des animaux.

Les probiotiques ont des propriétés antimicrobiennes intéressantes : inhibition des germes potentiellement pathogènes dans le tractus digestif, stimulation des défenses immunitaires et de la sécrétion d'enzymes antimicrobiennes, régulation de la flore endogène. De nombreuses bactéries utilisées comme probiotiques produisent des

bactériocines, substances antibiotiques leur conférant un avantage compétitif vis-à-vis de la flore intestinale complexe. Cependant, l'efficacité des probiotiques doit être étudiée au cas par cas à la fois selon le microorganisme et selon l'animal hôte.

Lan et al. (2004) ont testé deux souches de *Lactobacillus* comme probiotiques chez des poulets. Ces probiotiques ont permis un enrichissement de la diversité en Lactobacilles dans le jéjunum et le cæcum des animaux. Guo et al. (2006) ont testé l'apport de  $2,2 \times 10^5$ ,  $2,2 \times 10^6$  et  $2,2 \times 10^7$  UFC/g d'aliment de la souche MA139 de *Bacillus subtilis* chez des porcs. Ils ont démontré que ce probiotique permettait une augmentation du GMQ de 10% et une amélioration de 6% de l'efficacité de conversion alimentaire des animaux. De plus, l'apport de *Bacillus subtilis* MA139 a entraîné une augmentation significative des Lactobacilles (+0,6 logs (UFC/g)) et une diminution significative des *E. coli* (-0,3 logs (UFC/g)) dans les fèces de ces animaux, résultats prometteurs pour l'utilisation de cette souche en tant qu'alternative aux AFCs.

Plusieurs probiotiques ont aussi été testés chez les veaux, donnant des résultats assez peu cohérents. Tout d'abord, en 1983, l'influence sur la microflore fécale de veaux de 7 jours d'un apport de  $10^9$  bactéries par kg d'aliment de la souche BIO-4R de *Streptococcus faecalis* a été étudiée (Ozawa et al., 1983). Quatorze jours après l'administration de la souche, les bactéries lactiques (Bifidobactéries, Streptocoques et Lactobacilles) étaient toujours présentes aux mêmes concentrations qu'en début d'expérience alors que leurs niveaux avaient diminué dans le groupe contrôle. Cette stabilisation de la flore bénéfique a été observée parallèlement à une réduction, voire une disparition des Salmonelles de la flore intestinale des animaux. En 1991, Jenny et al. ont évalué l'impact d'un apport en *Bacillus subtilis* ( $\approx 10^{10}$  UFC/jour) sur les performances de croissance de jeunes veaux. Seule une tendance à l'amélioration de l'efficacité de conversion de l'aliment a été observée. Enfin, une étude a démontré chez le veau l'efficacité d'un mélange de 6 espèces de *Lactobacillus* isolées de fèces de veaux. En effet, ce cocktail de *Lactobacillus* a permis de diminuer la mortalité de veaux âgés d'une semaine en réduisant la prévalence des diarrhées néonatales et les concentrations fécales en *E. coli* (Timmerman et al., 2005).

Donovan et al. (2002) ont étudié l'effet de l'Entérogard, mélange de FOS, d'allicine et de probiotiques (non spécifiés dans l'article) sur les performances de croissance et la santé de veaux de boucherie, comparativement à l'utilisation d'un mélange d'AFCs (néomycine et oxytétracycline). Il ressort de cette étude que l'Entérogard permet d'obtenir des résultats similaires à ceux observés avec les AFCs, en termes de GMQ et de fréquence et d'intensité des diarrhées chez les animaux.

L'ensemble des résultats obtenus chez les veaux avec des probiotiques sont donc encourageants mais de nombreuses études sont encore à faire afin de déterminer le mode d'action précis de ces probiotiques et de définir la meilleure association à utiliser pour le veau.

De plus, il faut noter que les coûts relatifs à l'utilisation de cette alternative sont 2 à 3 fois plus élevés que ceux des AFCs.

#### II-6.6 Plantes et extraits de plantes

De nombreux produits d'origine végétale sont déjà utilisés dans l'alimentation animale. Il s'agit principalement de plantes ou d'extraits de plantes, d'épices et d'huiles essentielles dont les principes actifs sont bénéfiques pour les animaux, mais aussi de produits analogues de synthèse.

Guo et al. (2004) ont testé l'efficacité d'extraits de *Lentinus edodes*, de *Tremella fuciformis* et d'*Astragalus membranaceus Radix*, deux champignons et une légumineuse, sur des poulets infectés à *Mycoplasma gallisepticum*. Bien que moins efficaces que l'AFC testé (apramycine), ces extraits ont néanmoins permis une amélioration des performances de croissance des animaux comparativement à celles des animaux nourris avec un aliment contrôle (sans AFC). De plus, ils ont stimulé le développement des Lactobacilles (+1 log) et des Bifidobactéries (+0,5 log), et inhibé les bactéries pathogènes telles qu'*E. coli* (-0,6 log), alors que l'antibiotique n'avait pas d'action, voire même une influence inverse, sur l'ensemble de ces groupes bactériens.

Parmi tous les produits d'origine végétale, les huiles essentielles semblent être les plus prometteuses. Elles stimulent d'une part l'appétit grâce à leur odeur typique, et

d'autre part les sécrétions digestives. Elles ont aussi, selon les différentes huiles, des propriétés antimicrobiennes et antiseptiques (Piva et Rossi, 1999), certainement dues à un changement de la solubilité des lipides membranaires bactériens (Stein et Kil, 2006). Il a également été démontré *in vitro* que les constituants hydrophobes des huiles essentielles sont capables de désintégrer les membranes d'*E. coli* ou de *S. typhimurium* (Lambert et al., 2001).

Parmi les huiles essentielles utilisées chez le porc, l'ail, l'origan et le thym ont été particulièrement étudiés. En plus de son activité antimicrobienne (Ross et al., 2001), l'ail réduit la production de radicaux libres et de lipides peroxidés (Close, 2000). L'addition d'extrait d'origan à l'alimentation de poulets a entraîné une réduction de la sévérité des coccidioses (Giannenas et al., 2003), et, dans le cas de porcelets, a amélioré les performances de croissance des animaux et a permis l'activation du système immunitaire non spécifique (Walter et Bilkei, 2004).

Il a également été démontré *in vitro* qu'un apport simultané de plusieurs huiles essentielles ou extraits d'huiles essentielles entraînait une réponse antimicrobienne plus importante que si une seule huile était utilisée (Piccaglia et al., 1993).

L'apport d'extraits de thé vert dans l'alimentation de jeunes veaux a permis l'augmentation des concentrations en *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* et la diminution de celle de *Cl. perfringens* dans les fèces des animaux, accompagnées d'une diminution de la fréquence d'apparition des diarrhées chez les animaux (Ishihara et al., 2001). De plus, en 2004, Duncan et al. ont testé l'influence d'un apport d'esculine et d'esculetine (extraits de coumarine végétale) chez des veaux contaminés par *E. coli*. Une diminution de la prévalence d'*E. coli* de 19 % a été observée chez les veaux traités, comparativement aux veaux témoins, réduisant ainsi l'apparition des diarrhées du groupe d'étude à zéro.

#### II-6.7 Un extrait d'huile essentielle particulier : le carvacrol

Le carvacrol ou 5-isopropyl-2-méthylphénol ( $C_{10}H_{14}O$ ) est présent dans les huiles essentielles d'origan (*Origanum vulgare*), de thym et de bergamote sauvage. Les huiles essentielles des différentes espèces de thym contiennent entre 5 et 75 % de carvacrol.

Il s'agit d'un composant phénolique (Figure 9) dont les propriétés biologiques sont nombreuses. C'est tout d'abord un puissant antioxydant (Mastelic et al., 2008). De plus, il inhibe *in vitro* la croissance de plusieurs souches bactériennes comme *E. coli* et *Bacillus cereus* (Du et al., 2008). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, le carvacrol cause des dommages au niveau de la membrane cellulaire et inhibe la prolifération du germe (Cox et Markham, 2007). Les propriétés antibactériennes du carvacrol sont principalement dues à sa capacité à détériorer la membrane bactérienne (Cristani et al., 2007 ; Di Pasqua et al., 2007).

Le carvacrol est également un activateur potentiel des canaux ioniques du récepteur TRPV3, provoquant une sensation de chaleur sur la langue (Xu et al., 2006).

Chez les rats, le carvacrol est rapidement métabolisé et excrété. La principale voie métabolique utilisée est l'estérification du groupement phénol avec l'acide sulfurique et l'acide glucuronique. Une autre voie minoritaire est l'oxydation du groupe terminal méthyl en alcool. Après 24 heures, seules de très faibles quantités de carvacrol ou de ses métabolites sont retrouvées dans les urines des rats (Austgulen et al., 1987).

Sa faible toxicité pour l'homme, son odeur agréable ainsi que ses propriétés antibactérienne (Didry et al., 1994 ; Lambert et al., 2001) et anti-oxydante (Aeschbach et al., 1994) ont fait du carvacrol un additif largement utilisé dans l'agroalimentaire pour prévenir les contaminations dans les aliments (Ultee et Smid, 2001).

Le carvacrol a été testé pour la première fois dans un régime alimentaire, dans l'objectif de contrôler les infections intestinales à *Helicobacter* chez l'homme, mais sans grand succès (Bergonzelli et al., 2003). Depuis, le rôle du carvacrol a été étudié, *in vivo* ou *in vitro*, dans des écosystèmes gastro-intestinaux complexes.

Il est cependant important d'être prudent quant à son utilisation en tant qu'additif alimentaire car Bimczok et al. ont récemment (2008) montré que le carvacrol était toxique

*in vitro*, à partir d'une concentration supérieure ou égale à 100 µM, sur des lignées de cellules épithéliales intestinales et de lymphocytes issues du porc.

Muhl et Liebert (2007) ont testé *in vivo* l'effet du carvacrol dans un mélange de FOS inuline, de thymol et de tannins chez les porcelets. Cette étude n'a démontré aucun effet du mélange à la fois sur les performances de croissance et sur les comptages microbiens des fèces et du contenu intestinal.

L'impact du carvacrol sur les performances zootechniques des animaux a également été étudié *in vivo* par Bampidis et al. (2005) qui ont eux, au contraire, observé une amélioration de l'efficacité de conversion des aliments chez des dindes suite à un apport de 1,25 g de feuilles d'origan/kg d'aliment, i.e. de 38 mg de carvacrol par kg d'aliment.

D'un point de vue microbiologique, Manzanilla et al. (2004) ont testé *in vivo* l'apport d'X-tract™, un additif commercialisé par Pancosma SA contenant un mélange de 5 % de carvacrol, 3 % de cinnamaldéhyde et 2 % d'oléorésine de capsicum, sur l'écosystème intestinal de porcs sevrés précocement. Cet apport a entraîné une diminution de la masse microbienne totale dans l'iléon et une augmentation du rapport Lactobacilles/Enterobactéries, favorisant donc les espèces à potentiel santé chez l'animal. Jamroz et al. (2005) ont démontré que le même additif (X-tract™) conduisait à une augmentation de l'efficacité de conversion des aliments, à une réduction des niveaux d'*E. coli*, de *Cl. perfringens* et des champignons, et à une augmentation des concentrations en Lactobacilles dans l'iléon de poulets. Cette diminution des espèces pathogènes s'expliquerait par des propriétés de protection des villosités intestinales du mélange aromatique (Jamroz et al., 2006), limitant l'attachement des bactéries pathogènes. Castillo et al. (2006) ont confirmé, dans le contenu caecal de porcs précocement sevrés, l'augmentation du rapport Lactobacilles/Entérocoques avec le même mélange d'extraits végétaux (1,1 vs. 0,5 pour les animaux sans aucun apport d'additif). Cependant, aucun changement n'a été observé dans cette étude concernant la masse microbienne, mais il est apparu que X-tract™ entraînerait une augmentation de la biodiversité de l'écosystème



(mesuré par RFLP), comparativement à celle observée lors d'un régime avec AFC (avilamycine).

Enfin, une autre étude a montré que X-tract™ avait un impact sur le système immunitaire de porcelets sevrés (Nofrarias et al., 2006). En effet, l'apport d'X-tract™ dans l'alimentation a entraîné une augmentation des concentrations en monocytes dans le sang et de la densité des lymphocytes de la *lamina propria*.

Une étude *in vitro* (Busquet et al., 2006) portant sur l'impact du carvacrol sur la fermentation ruminale bovine a été effectuée, en partenariat avec Pancosma SA, grâce à des systèmes de fermentation batch. Cette étude a montré que le carvacrol utilisé au taux de 3 g/L de contenu fermentaire entraîne une nette diminution de la concentration en ammoniacque produit. D'après ces résultats, le carvacrol pourrait conduire à une diminution de la toxicité des produits de fermentation envers l'animal.

Ainsi, d'après les différentes études *in vivo* et *in vitro* réalisées, le carvacrol présente de nombreux atouts pour le remplacement des AFCs. En effet, il permet une amélioration des performances de croissance et une modification de la microflore intestinale favorisant les bactéries lactiques bénéfiques pour l'hôte.

Les antibiotiques ont été largement utilisés dans les élevages intensifs afin d'améliorer les performances de croissance des animaux. Ils ont indirectement limité les pathologies gastro-intestinales liées à des conditions d'hygiène médiocres. Les bénéfices des AFCs semblent étroitement liés à leur action sur la microflore, bien que leur mode d'action ne soit pas précisément connu. Ils ont cependant significativement participé à un problème de santé publique majeur : la création de réservoirs de germes résistants aux antibiotiques. Les autorités européennes ont donc décidé d'interdire en 2006 la totalité des antibiotiques utilisés comme additifs alimentaires dans l'alimentation animale. Depuis cet arrêt, les éleveurs sont confrontés à une perte des performances de leurs animaux et à une recrudescence des pathologies gastro-intestinales. Ainsi, plusieurs composés sont candidats

au remplacement des AFCs. Les plus prometteurs sont les prébiotiques, les probiotiques et les extraits de plantes. Dans cette dernière catégorie, le carvacrol, extrait de l'huile essentielle d'origan, constitue un bon candidat au remplacement des AFCs car il permettrait une amélioration des performances de croissance et une inhibition des germes pathogènes ou de leur fixation dans le tractus intestinal des animaux.

Le veau de boucherie étant une production à faible volume comparée aux productions de porcs et de volailles, peu de recherches ont été effectuées chez cette espèce animale.

Chez le veau, seules des études *in vivo* ont été mises en place afin de trouver un additif alimentaire permettant de limiter les conséquences de l'arrêt des AFCs. Le travail de « screening » à réaliser reste énorme. Les résultats obtenus à ce jour sont peu cohérents. Les probiotiques n'ont pas pour le moment apporté de solution concrète. Les prébiotiques semblent améliorer les performances de croissance et les conditions sanitaires des animaux. Cependant, peu de résultats ont été obtenus sur leur impact au niveau de la microflore. Il est donc devenu important de rechercher une solution à grande échelle. Le développement d'outils *in vitro*, permettant une étude de l'impact de plusieurs additifs alimentaires sur la microflore intestinale des veaux, constitue une solution éthique et économique, indispensable. De tels outils limitent en effet le nombre d'expérimentation sur animaux. Cependant, avant toute mise au point d'un modèle, il est nécessaire de regrouper un maximum d'informations sur la microflore de l'écosystème des veaux.

## CHAPITRE III :

### LA MICROFLORE DU VEAU ET LES PATHOLOGIES DIGESTIVES LIEES

---

Le tractus gastro-intestinal des vertébrés abrite une microflore composée de diverses espèces, surtout bactériennes. Les bactéries gram-positives prédominent (Mackie et al., 1999 ; Savage, 1977). Pas moins de 500 espèces bactériennes colonisent le tractus gastro-intestinal, avec des concentrations allant jusqu'à  $10^{12}$  cellules par gramme de contenu dans le côlon ou les fèces (Moore et Holdeman, 1974 ; Savage, 1977). Ces valeurs sont cohérentes avec l'hypothèse que la population bactérienne surpasse l'hôte, en nombre de cellules (Gaskins, 2001). La population bactérienne intestinale influence une grande variété de processus immunologiques, physiologiques et nutritionnels du système gastro-intestinal de l'hôte. Elle exerce de ce fait une action sur le développement, les performances de croissance et la santé des animaux monogastriques. Des expériences comparant des animaux élevés de manière conventionnelle et des animaux axéniques ont conforté l'hypothèse que les bactéries commensales ont un rôle important dans l'apport de composés nutritionnels et des conséquences au niveau des organes, des tissus et du développement du système immunitaire (Gaskins, 2001 ; Snel et al., 2002).

Les bénéfices transmis par la microflore entraînent en contre-partie des inconvénients pour l'animal, même dans des conditions idéales. En effet, les bactéries entrent en compétition avec l'hôte pour les nutriments, secrètent des composés toxiques, et induisent en continu une réponse immunitaire/inflammatoire du tractus gastro-intestinal. Ces conséquences impactent de façon négative la santé et les performances de croissance de l'animal.

### III-1. Mise en place de la microflore intestinale

Dès la naissance, le tractus digestif du jeune animal est colonisé par une succession de populations microbiennes. Ces vagues de populations, qui sont remarquablement similaires chez les poulets, les porcelets et les veaux (Mackie et al., 1999), exercent une profonde influence sur les performances de croissance, le développement et la santé de l'animal.

Avant l'éclosion ou la naissance, le tractus gastro-intestinal est stérile (Kelly et King, 2001 ; Kenworthy et Crabb, 1963). Des bactéries issues de l'environnement, de la mère (dans le cas des mammifères) et de l'alimentation commencent à coloniser le tractus presque immédiatement après la mise au monde. Cinq à 6 heures après la naissance, les fèces des animaux contiennent déjà  $10^9$  à  $10^{10}$  UFC/g de fèces (Snel et al., 2002). Les espèces aérobies et anaérobies facultatives comme *E. coli*, les lactobacilles et les streptocoques colonisent le système gastro-intestinal immédiatement après la naissance. Les concentrations sont faibles (de  $10^2$  à  $10^5$  UFC/mL de contenu colique) mais augmentent rapidement. Ces espèces jouent le rôle de réducteurs en consommant l'oxygène présent et préparent alors l'environnement pour l'établissement des espèces anaérobies strictes et d'autres espèces anaérobies facultatives, qui constitueront ensuite les espèces prédominantes de la flore stable. Cette nouvelle microflore inclut les genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Clostridium*. Le niveau de tous les groupes bactériens augmente rapidement au cours de la croissance de l'animal. Par exemple, Pedersen et Tannock (1989) ont reporté une multiplication par un facteur 10 des concentrations en lactobacilles dans l'œsophage, l'estomac, le duodénum, le jéjunum et l'iléon de porcelets entre leur naissance et le 10<sup>ème</sup> jour de la vie. La plupart des études sur la mise en place de la microflore intestinale chez les jeunes animaux ont été réalisées chez la souris et le poulet (Mead, 1997 ; Tannock, 1997).

Seules quelques études ont été effectuées chez le veau, et uniquement en ce qui concerne les microorganismes présents dans les fèces (Lukas et al., 2007 ; Rada et al., 2006). Chez le veau, les microorganismes auxquels est exposé l'animal à la naissance sont issus de la salive, du vagin, des déjections et de la peau de la mère, ainsi que de

l'environnement direct. Il est couramment accepté que les lactobacilles constituent le groupe bactérien dominant de la microflore intestinale des veaux nourris au lait, avec des concentrations comprises entre 7 et 9 logs d'UFC/g de fèces à l'âge d'une semaine (Wallace et Newbold, 1992). Néanmoins, Lukas et al. (2007) ont démontré par DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) que le premier microorganisme colonisant les fèces des veaux est *E. coli*, suivi par l'espèce *Bifidobacterium animalis*. Les genres *Bacteroides*, *Clostridium* et *Faecalibacterium* sont apparus, lors de cette étude, au moment de la transition alimentaire du colostrum au lait à 5 jours. Rada et al. (2006) ont également démontré que les Bifidobactéries étaient présentes en grand nombre (>9 logs/g de fèces) dans les fèces de veaux de 3 jours, nourris avec un aliment d'allaitement. De plus, ils ont démontré qu'une augmentation de la ration en foin entraîne une diminution de la concentration en *E. coli*, parallèlement à une augmentation de la concentration en Bifidobactéries.

Ainsi, la colonisation du tractus gastro-intestinal des veaux dépend d'un grand nombre de facteurs, en particulier de l'environnement direct du veau (mère, bâtiment, déjection des autres animaux) et du type d'alimentation (colostrum, lait, aliment d'allaitement, foin). Les veaux de boucherie sont nourris à l'aliment d'allaitement dès leur dixième jour. Ils sont dans un environnement défini, sans changement au cours de leur croissance, jusqu'à la fin de l'engraissement. On peut donc imaginer que leur microflore intestinale s'établit dès leur arrivée chez l'engraisseur et reste globalement identique jusqu'à leur abattage.

### **III-2. Microflore du tractus digestif du veau**

Chez le veau en bonne santé, l'intestin grêle n'est pas un lieu de prolifération bactérienne, car le transit du chyme y est trop rapide pour que les bactéries aient le temps de s'y diviser. Le contenu intestinal peut aussi présenter une acidité trop importante, notamment dans le duodénum (Richards et al., 2005). On y retrouve donc majoritairement des microorganismes transitant avec le chyme alimentaire. La stase alimentaire n'est de

règle que dans l'iléon et le caecum/côlon, où les bactéries ont le temps requis pour se multiplier. C'est donc dans ces compartiments digestifs et dans les fèces que l'on retrouve les concentrations les plus élevées en microorganismes.

### III-2.1 Grands groupes microbiens identifiés chez le veau

La flore intestinale des animaux d'élevage, comprenant près de 500 espèces différentes de micro-organismes, est répartie en plusieurs catégories (Richards et al., 2005) :

- Flore principale : > 90%, anaérobies strictes et anaérobies-aérobies facultatives : *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* et *Eubacterium* principalement,
- Flore satellite : < 1%, aérobies-anaérobies facultatives : *E. coli* et *Enterococcus*,
- Flore résiduelle : < 0.01%, *Clostridium*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et levures du genre *Candida*.

Chez le veau de boucherie, un nombre limité d'études a été réalisé sur la microflore intestinale. Les données sont répertoriées dans la Figure 10. Cependant, ces données sont difficiles à analyser car les études ont été effectuées chez des animaux d'âge et d'alimentation très différents et dans des compartiments intestinaux variés. De plus, certaines études datent des années 1960, 1970 et les modes d'élevage des animaux ont évolué depuis, avec des conditions d'hygiène plus strictes et une alimentation plus contrôlée. Or, la microflore est fortement influencée par ces facteurs environnementaux. Très peu d'études ont été réalisées par biologie moléculaire, la majorité ayant été effectuée par des méthodes culturales. Seuls, Busconi et al. (2008) ont étudié la prévalence des bactéries lactiques dans le tractus de veaux âgés de 65 jours, nourris principalement avec de l'aliment d'allaitement (67% de la ration) et avec un mélange de céréales (maïs et orge). Ils ont montré par AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) que les *Lactobacillus* étaient le genre le plus représenté des bactéries lactiques (54 % des souches isolées du tractus des veaux), suivies par les *Streptococcus* (32 %). L'espèce la plus fréquemment rencontrée était *L. mucosae* (28% des isolats totaux).

On peut tout de même remarquer sur la Figure 10 que les groupes microbiens qui ont été identifiés chez le veau par des méthodes culturales sont relativement nombreux, avec une flore anaérobie totale dominant logiquement toutes les autres flores dénombrées avec une concentration comprise entre 7 et 11 logs (UFC/g de contenu intestinal), sur l'ensemble du tractus digestif. La flore aérobie totale est sous-dominante avec une concentration comprise entre 6 et 9 logs (UFC/g). Les genres anaérobies-aérobies facultatifs tels que les lactobacilles, *Bacteroides*, entérocoques et bifidobactéries sont présents à des niveaux intermédiaires et variables, compris entre 4 et 9 logs (UFC/g). Les coliformes et l'espèce *E. coli* sont présents à des niveaux encore plus variables, avec des concentrations comprises entre 2 et 9 logs (UFC/g). Enfin, l'espèce *Cl. perfringens* et les levures sont clairement minoritaires dans le tractus gastro-intestinal du veau avec des niveaux oscillant entre 2 et 5 logs (UFC/g). Deux populations microbiennes n'ont été retrouvées qu'une seule fois dans la littérature, empêchant toute conclusion à leur sujet : i) les bactéries utilisatrices de lactate, avec une concentration proche de celle de la flore anaérobie totale, démontrant que la plupart des bactéries dénombrées sont capables d'utiliser le lactate, et ii) les *Eubacterium*, avec une concentration faible (Ishihara et al., 2001) : 3,8 logs (UFC/g), les plaçant au rang de sous-dominants, contrairement à ce qu'a énoncé Richards et al. (2005) en les plaçant dans la flore principale.

De plus, on peut observer pour la flore anaérobie totale, les lactobacilles, les entérocoques et les bifidobactéries, une évolution des concentrations tout au long du tractus digestif caractéristique, avec une forte concentration dans le rumen, diminuant significativement dans le duodénum, puis augmentant de façon progressive du jéjunum au cæcum, et restant stable jusque dans les fèces. Les *Bacteroides* sont par contre présents à de faibles concentrations dans le rumen, puis leur niveau augmente progressivement jusqu'au cæcum, où il semble atteindre une valeur maximale, maintenue dans les fèces. La flore aérobie totale est peu présente dans le rumen, le duodénum et le jéjunum ( $\approx 7$  logs), mais sa concentration augmente ensuite pour atteindre 8 à 9 logs dans les parties distales du tractus. La population des coliformes et des *E. coli* est difficile à analyser. En effet, des écarts de plus de 3 logs sont parfois observés entre deux études dans le même

compartiment intestinal. Cependant, il semble globalement que les coliformes sont présents en très faibles concentrations dans le rumen, et qu'ils se développent de façon progressive du duodénum aux fèces. *Cl. perfringens* n'a été dénombré que dans l'intestin grêle et les fèces, compartiments dans lesquels sa concentration est constante ( $\approx 4,5$  logs). Enfin, les levures semblent aussi être présentes en moins fortes concentrations dans le rumen et le duodénum que dans le reste de l'intestin grêle et dans le caecum. Une étude (Collado et Sanz, 2007), réalisée dans le rumen, le duodénum et le côlon, montre des concentrations plus faibles (entre 2 et 6 logs/g de contenu) que celles mesurées dans les autres études pour tous les microorganismes dénombrés. Ce résultat est cependant cohérent car il s'agit d'un dénombrement des microorganismes attachés à la muqueuse intestinale et non de la microflore du chyme.

### III-2.2 Caractéristiques métaboliques des groupes microbiens dénombrés dans le tractus digestif du veau

Ce paragraphe présente les principales caractéristiques métaboliques des différents groupes ou espèces microbiens dénombrés dans le tractus gastro-intestinal du veau (Tableau 4).

#### *III-2.2.1 Flore anaérobie totale*

Cette flore regroupe l'ensemble des espèces pouvant se développer en anaérobiose. Elle comprend à la fois les espèces anaérobies strictes et celles aéro-anaérobies facultatives. Seules sont exclues de cet ensemble les bactéries aérobies strictes.

Dans le tractus gastro-intestinal, cette flore est majoritaire vis-à-vis de la flore totale aérobie, puisque le système digestif constitue une enceinte quasiment dépourvue en oxygène.

#### *III-2.2.2 Flore aérobie totale*

Cet ensemble regroupe toutes les espèces pouvant se développer au contact de l'oxygène et comprend donc les espèces aérobies strictes et aéro-anaérobies facultatives.



Dans le tractus gastro-intestinal, la flore aérobie consomme l'oxygène présent, réduisant l'environnement et permettant alors le développement des espèces anaérobies strictes.

#### *III-2.2.3 Flore utilisatrice de lactate*

La flore utilisatrice de lactate regroupe toutes les espèces capables d'utiliser le lactate comme unique source de carbone. Elle permet également de déterminer le rapport entre les producteurs et les utilisateurs de lactate dans un écosystème complexe.

#### *III-2.2.4 Bifidobactéries*

Le genre *Bifidobacterium* fait partie de la famille des *Bifidobacteriaceae*, unique famille de l'ordre des *Bifidobacteriales*. Ce genre regroupe les bactéries en forme de bâtonnets Gram-positifs, non sporulants, non mobiles, souvent ramifiés. Ce sont des bactéries anaérobies fermentant les glucides pour produire de l'acide acétique ou lactique, mais pas de dioxyde de carbone. Elles sont catalase-négatives (Prescott et al., 2003).

Les *Bifidobacterium* sont des bactéries commensales de l'intestin de l'homme et des animaux, non pathogènes.

#### *III-2.2.5 Lactobacilles*

Le genre *Lactobacillus* est le plus grand de l'ordre des *Lactobacillales* avec près de 80 espèces. Il s'agit de bâtonnets Gram-positifs, non sporulants et parfois des coccobacilles, dépourvus de catalase et de cytochrome. Ils sont généralement anaérobies facultatifs ou microaérophiles, donnent de l'acide lactique comme produit de fermentation unique ou majeur, et ont des besoins nutritionnels complexes. Ils sont résistants à la vancomycine. Ils se développent au mieux dans des conditions légèrement acides, quand le pH avoisine les 4,5 à 6,4 (Prescott et al., 2003).

Les *Lactobacillus* sont des bactéries commensales du tractus gastro-intestinal et du vagin de l'homme et des animaux, non pathogènes. Elles sont également utilisées dans la production d'aliments fermentés comme les yaourts.

### III-2.2.6 *Bacteroides*

Le phylum des *Bacteroidetes*, très diversifié, compte trois classes : les *Bacteroides*, les *Flavobacteria* et les *Sphingobacteria*.

Les *Bacteroides* sont des bâtonnets Gram-négatifs de formes variées, anaérobies, non sporulants, saccharolytiques et résistants à la kanamycine (Prescott et al., 2003).

Ce sont des chimiohétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils utilisent des produits organiques comme sources métabolique d'énergie, d'hydrogène, d'électrons et de carbone. Ils produisent généralement un mélange d'acides organiques comme produits finaux de la fermentation dont les principaux sont les acides acétique, iso valérique et succinique. Ils ne réduisent ni les sulfates, ni d'autres composés soufrés. Les espèces appartenant au groupe *fragilis* sont pénicilline-résistantes grâce à leur production de  $\beta$ -lactamases. Elles résistent également à la bile, la vancomycine et la colistine.

Environ 30 % des bactéries isolées des fèces humaines font partie du genre *Bacteroides* (Prescott et al., 2003).

### III-2.2.7 *Eubacterium*

Le genre *Eubacterium* fait partie de la famille des *Clostridiaceae* dans le phylum des Firmicutes. L'analyse de la séquence du gène de l'ARN 16S ribosomique classe le genre *Eubacterium* dans le groupe des bactéries à Gram-positif à G + C % élevé (Fenollard, 1998). Ce genre est très hétérogène (G + C % variant de 30 à 55 selon les espèces) et il est principalement défini sur la base de caractères négatifs. Il regroupe 46 espèces ayant comme seul point commun d'être des bactéries à Gram positif, non sporulées, anaérobies strictes, catalase négatives, chimio-organotrophes, ne produisant pas de gaz en gélose profonde et dont les produits terminaux majeurs du métabolisme ne sont ni l'acide propionique ni l'acide lactique ni l'acide succinique ni un mélange d'acide acétique et d'acide lactique. Selon les espèces, ce sont des bactéries mobiles ou immobiles, actives ou inactives sur les sucres [4].

Les espèces du genre *Eubacterium* qui font partie de la flore commensale de la cavité buccale et des intestins de l'homme et de l'animal sont aussi retrouvées au niveau du sol.

Du fait de son hétérogénéité, le genre *Eubacterium* est en perpétuel remaniement et 7 espèces ont été reclassées dans les genres *Actinobaculum*, *Atopobium*, *Collinsella*, *Eggerthella*, *Mogibacterium*, *Pseudoramibacter* ou *Slackia* [4].

#### III-2.2.8 Coliformes et espèce *Escherichia coli*

Les coliformes sont des membres de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce groupe comprend les espèces *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* et *Klebsiella pneumonia*. On définit les coliformes comme des bactéries en forme de bâtonnets, non sporulantes, Gram-négatives, anaérobies facultatives et qui fermentent le lactose en 48 heures à 35 °C, en produisant du gaz. Les coliformes dégradent les sucres par la voie d'Embden-Meyerhof (Prescott et al., 2003). Ce sont des bactéries commensales du tractus gastro-intestinal et des voies respiratoires de l'homme et des animaux.

*Escherichia coli* est certainement la bactérie la plus étudiée à ce jour. Elle réalise une fermentation acide mixte et produit principalement du lactate, de l'acétate, du succinate, du formiate et de l'éthanol. 94 à 97 % des *E. coli* sont  $\beta$ -D-glucuronidase-positives.

C'est une espèce commensale de l'intestin de l'homme et des animaux. Si la plupart des souches d' *E. coli* sont bénéfiques, voire essentielles, certaines souches peuvent être associées à des pathologies très diverses (y compris extra-intestinales), tant chez l'homme que chez l'animal : diarrhées, gastro-entérites, infections du tractus urinaire, ... (Prescott et al., 2003)

#### III-2.2.9 Entérocoques et Streptocoques du groupe D

Les *Enterococcus* et les *Streptococcus* sont deux genres faisant partie de l'ordre des *Lactobacillales*, ordre plus connu sous le nom de bactéries lactiques. Cet ordre regroupe en effet toutes les bactéries dont le seul produit de fermentation est l'acide lactique. Ces bactéries ne sporulent pas et ne sont généralement pas mobiles. Ce sont des organismes exigeants qui sont généralement considérés comme des organismes anaérobies aérotolestants (Prescott et al., 2003).

Le genre *Streptococcus* regroupe des espèces constituées de coques chimiohétérotrophes, mésophiles, non sporulants et Gram-positifs. Ces espèces sont anaérobies facultatives et catalase-négatives. Elles réalisent une fermentation homolactique (fermentation où les sucres sont presque complètement transformés en acide lactique). Les *Streptococcus* sont divisés en plusieurs serogroupes par la méthode de Lancefield (1928). Les *Streptococcus* de l'intestin, qui sont caractérisés par leur résistance à la bile et une réaction positive à l'esculine, sont rassemblés dans le groupe D de Lancefield. Suite à une modification de la classification dans les années 1980 due à l'utilisation de méthodes moléculaires pour la caractérisation des microorganismes, la majorité de ces *Streptococcus* ont été reclassés dans un nouveau genre : les *Enterococcus*. Les *Enterococcus* sont distingués des *Streptococcus* du groupe D par un seul caractère : leur résistance à un milieu hypersalé à 6,5 % de NaCl (Prescott et al., 2003).

#### III-2.2.10 *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* est une espèce du genre *Clostridium*, genre le plus important de la classe des *Clostridia*. Ce genre inclut des bactéries Gram-positives, anaérobies, formant des endospores (spore à paroi épaisse, dormante, extrêmement thermo- et chimiorésistante, formée dans une bactérie) et n'effectuant pas la réduction catabolique du sulfate (Prescott et al., 2003). La plupart des colonies sont hémolytiques.

*Cl. perfringens* se distingue des autres *Clostridia* par son immobilité et l'existence d'une capsule. Ses bâtonnets sont épais et courts, avec des spores rarement visibles. En culture, il est fortement hémolytique et produit une quantité importante de gaz par fermentation.

Cette bactérie fait partie de la flore commensale du tractus gastro-intestinal de l'homme et de l'animal. Cependant elle peut devenir hautement pathogène.

Cette espèce est retrouvée dans les plaies gangréneuses lorsqu'elle sécrète une exotoxine protéique (lécithinase : la toxine  $\alpha$ ) qui désorganise les membranes cellulaires, en particulier musculaires. *Cl. perfringens* sécrète également une désoxyribonucléase (DNase), une hyaluronidase et une collagénase dont l'action favorise l'extension de l'infection à *Cl. perfringens*.

Certaines souches sont également responsables d'intoxications alimentaires via la sécrétion d'une entérotoxine thermolabile au cours de la sporulation.

Enfin, l'espèce *Cl. perfringens* est responsable d'entérites nécrosantes chez l'homme et chez l'animal, dues à la sécrétion de toxines  $\beta$ , et d'entérotoxémies chez les bovins via la sécrétion de toxines  $\alpha$  et  $\beta$ 2.

### III-2.2.11 Levures

Les levures sont des champignons. Ce sont des mycètes unicellulaires ayant une reproduction asexuée par bourgeonnement. Elles sont aérobies-anaérobies facultatives. Toutes les levures sont capables de dégrader le glucose, le fructose et le mannose en présence d'oxygène, par un métabolisme oxydatif, conduisant à la formation de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>O. En plus du métabolisme oxydatif, certaines levures peuvent privilégier une dégradation des glucides par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation d'éthanol et de CO<sub>2</sub>.

Les levures sont des microorganismes commensaux de la peau, du tractus gastro-intestinal et de l'appareil uro-génital de l'homme et de l'animal. L'espèce *Candida albicans* est plus particulièrement présente au niveau gastro-intestinal [5].

### III-3. Avantages et inconvénients associés au microbiote intestinal

Il est clair que la microflore est source de nombreux bénéfices pour l'animal. Par exemple, la microflore participe à la nutrition de l'animal via ses produits de fermentation, et à sa protection grâce à des processus d'inhibition de la colonisation par des pathogènes. Cependant, ces bénéfices ont un coût. En effet, la microflore intestinale est en compétition avec l'hôte pour les nutriments, elle stimule un renouvellement rapide des cellules épithéliales, nécessite un taux élevé de sécrétion de mucus par les cellules intestinales et stimule le développement du système immunitaire et les réponses inflammatoires, tout ceci entraînant des coûts énergétiques importants pour l'hôte (Dibner et Richards, 2005). Tous ces effets entraînent une réduction des performances de croissance de l'animal. Par exemple, les tissus intestinaux chez le porc représentent seulement 5 % du poids corporel

de l'animal, or ils représentent 15 à 35 % de la consommation totale d'oxygène et du renouvellement protéique de l'organisme à cause de leur interaction avec la microflore. De plus, 90 % des protéines synthétisées par le tractus gastrointestinal sortent de l'organisme via la sécrétion du mucus et la desquamation des cellules épithéliales pour la protection de l'hôte contre l'écosystème microbien (Gaskins, 2001).

### III-3.1 Avantages

#### *III-3.1.1 Effet barrière contre les pathogènes*

Le bénéfice majeur apporté par la microflore commensale réside dans la résistance à la colonisation par des germes pathogènes ou d'autres microorganismes non indigènes, appelé aussi effet barrière (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007) ou exclusion compétitive (Gaskins, 2001 ; Kelly et King, 2001 ; Snel et al., 2002). De nombreuses études ont démontré que les animaux axéniques sont beaucoup plus sensibles à la colonisation par des pathogènes que les animaux conventionnels (Gordon et al., 1966 ; Koopman et al., 1984). Ducluzeau et Raibaud (1979) ont bien caractérisé ce phénomène chez la souris. La flore commensale exerce un effet bactériostatique vis-à-vis d'espèces exogènes, qui sont ensuite éliminées à la vitesse du transit digestif (Figure 11). La barrière est dite « permissive » lorsqu'elle autorise un portage sain, elle est dite « drastique » lorsque le microorganisme est totalement éliminé. Le ou les mécanismes de cette protection ne sont pas clairement démontrés mais de nombreuses hypothèses ont été proposées. La plupart des chercheurs pensent que la microflore résidante empêche la colonisation i) par la sécrétion de composés antimicrobiens comme les AGCC, ii) par stimulation directe du système immunitaire, et iii) par compétition pour les nutriments et les sites d'attachement à la muqueuse (Kelly et King, 2001).

#### *III-3.1.2 Stimulation du système immunitaire*

Un deuxième bénéfice apporté par la microflore est la stimulation des défenses immunitaires intestinales de l'hôte. La microflore stimule à la fois (Kelly et King, 2001 ; McCracken et Gaskins, 1999) la production de mucus, le développement des cellules

épithéliales et la prolifération des cellules immunitaires de la *lamina propria* (tissu conjonctif sous l'épithélium contenant les cellules de l'immunité). Le mucus a pour rôle d'isoler les tissus de l'hôte de la microflore commensale et des microorganismes pathogènes. L'épithélium, pour sa part, constitue une barrière contre l'entrée des microorganismes dans les tissus lorsque le mucus a été traversé. Enfin, le réseau sous-jacent de cellules immunitaires de la *lamina propria* apporte des cellules T cytotoxiques, des lymphocytes T<sub>4</sub> et des cellules phagocytaires, ainsi que des anticorps. Les cellules immunitaires combattent non seulement les bactéries pathogènes et leurs toxines, mais également la prolifération ou un attachement anormal de la microflore commensale à la muqueuse intestinale.

La majorité des recherches supporte l'idée que le système immunitaire intestinal se développe en parallèle avec le développement de la microflore commensale. L'introduction de seulement quelques espèces de bactéries commensales chez des animaux gnotoxéniques suffit pour stimuler le développement du système de sécrétion des IgA (McCracken et Gaskins, 1999). Certaines espèces bactériennes à Gram-négatif, comme *E. coli* ou *Bacteroides*, semblent jouer un rôle important dans cette stimulation (Tableau 5) puisque leur seule présence dans le tube digestif de souris gnotoxéniques est capable de provoquer une stimulation égale à la moitié de celle mesurée avec une flore intestinale complète, en terme de nombre de plasmocytes à IgA par villosité intestinale (Moreau et al., 1982). Comparativement aux animaux conventionnels, les animaux axéniques présentent un développement plus tardif des lymphocytes et autres cellules immunitaires dans la *lamina propria* et un nombre bien moins important de plasmocytes à IgA (Berg et Savage, 1975 ; Gordon et Pesti, 1971 ; Rothkotter et al., 1994 ; Umesaki et al., 1999 ; Umesaki et al., 1993).

### *III-3.1.3 Apport de nutriments*

Un troisième bénéfice apporté par la microflore résidente est la mise à disponibilité pour l'hôte de nutriments produits par la flore. Ces nutriments incluent les acides gras à courtes chaînes (AGCC), les acides aminés, ainsi que les vitamines B et K (Savage, 1986 ;

Snel et al., 2002). Les AGCC comme l'acétate, le butyrate et le propionate sont des anions très répandus dans le côlon du porc, produits par des espèces anaérobies qui fermentent les fibres alimentaires (Kelly et King, 2001). Les bactéries commensales chez le poulet génèrent du lactate en plus de ces AGCC (Barnes et al., 1979 ; van Der Wielen et al., 2000). Les AGCC contribuent de façon significative à la fourniture d'énergie pour l'animal. De plus, ils jouent un rôle important dans l'inhibition des microorganismes indésirables du cæcum comme les *Enterobacteriaceae* (Snel et al., 2002 ; van Der Wielen et al., 2000). Les AGCC, et en particulier le butyrate, stimulent aussi la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin et l'augmentation de la taille des villosités, développant alors la surface d'absorption des nutriments (Galfi et Bokori, 1990 ; Sakata et Inagaki, 2001).

### III-3.2 Inconvénients

Malgré tous ces bénéfices, la microflore intestinale impose des contreparties coûteuses pour l'animal. Ces inconvénients incluent la compétition pour les nutriments, la production de catabolites toxiques, une diminution de la digestibilité des matières grasses et l'augmentation de la sécrétion de mucus et du taux de renouvellement des cellules épithéliales de l'intestin. Ces effets constituent des obstacles aux performances de croissance des animaux.

#### *III-3.2.1 Compétition pour les nutriments et la production de métabolites toxiques*

Il est largement reconnu que les bactéries entrent en compétition avec l'hôte pour les nutriments (Furuse et Okumura, 1994). Des expériences ont démontré que près de 6 % de l'énergie nette de l'alimentation des porcs est utilisée par la microflore (Vervaeke et al., 1979). Les bactéries sont également en compétition pour les acides aminés, réduisant ainsi l'utilisation de l'azote par l'hôte (Furuse et Yokota, 1985). Ces acides aminés peuvent être intégrés aux protéines bactériennes (Salter et al., 1974) ou utilisés pour créer de l'énergie, produisant alors des catabolites toxiques (Gaskins, 2001 ; Russell, 1983). Parmi ces produits, on trouve l'ammoniaque, des amines, des phénols et des indoles. L'ammoniaque est produite par désamination des acides aminés et par hydrolyse de l'urée. Des



concentrations élevées en ammoniacque ont un impact négatif sur la croissance animale (Pond et Yen, 1987 ; Veldman et van der Aar, 1997), ceci en partie dû à une augmentation du renouvellement des cellules épithéliales (Vissek, 1978a). Les amines toxiques (histamine et cadavérine par exemple) sont produites par décarboxylation des acides aminés. Un grand nombre d'espèces bactériennes (en particulier les *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacterium*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*) réalise ce type de réaction. Chez les porcelets en sevrage, une hausse de la production en amines entraîne une augmentation des diarrhées (Porter et Kenworthy, 1969). Enfin, les phénols et les indoles sont produits par les genres *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium* et *Bifidobacterium*, via le catabolisme des acides aminés aromatiques (Gaskins, 2001). Ces composés ont un impact négatif à la fois sur les performances de croissance (Yokoyama et al., 1982) et sur les caractéristiques organoleptiques de la viande (Lundstrom et al., 1988).

#### *III-3.2.2 Diminution de la digestibilité des lipides*

La microflore interfère également sur la digestibilité des lipides. En effet, les acides biliaires et leurs sels sont nécessaires pour la digestion et l'absorption des matières grasses. Une fois sécrétés dans le tractus gastro-intestinal, ils sont catabolisés par un grand nombre d'espèces bactériennes, mais surtout par le genre *Lactobacillus* (Baron et Hylemon, 1997). Ce catabolisme réduit l'absorption lipidique (Eyssen, 1973) et produit des métabolites toxiques qui inhibent les performances de croissance de l'animal (Baron et Hylemon, 1997).

#### *III-3.2.3 Augmentation de la sécrétion de mucus et du taux de renouvellement des cellules épithéliales intestinales*

La microflore résidante entraîne une intensification de la sécrétion de mucus et du renouvellement des cellules épithéliales intestinales.

Bien qu'une des fonctions majeures du mucus soit de lubrifier le tractus gastro-intestinal, il sert aussi à prévenir l'attachement de la microflore et donc l'invasion des bactéries dans les cellules de l'hôte. Puisque la majeure partie des bactéries constituant la

microflore intestinale digère (enzymatiquement) la couche de mucus, l'hôte doit constamment en sécréter (Gaskins, 2001).

Les cellules sécrétant la mucine, et les entérocytes des villosités intestinales ont un temps de vie très court. L'épithélium intestinal a donc le taux de renouvellement le plus important de tous les tissus (Imondi et Bird, 1966). Ce renouvellement est accompagné par un métabolisme cellulaire et une synthèse protéique très importants, correspondants à 23 à 26 % de la dépense totale d'énergie de l'organisme (Cant et al., 1996 ; Summers, 1991). Le taux de renouvellement des cellules épithéliales intestinales, ainsi que les besoins en énergie et en acides aminés sont augmentés par la présence de la microflore commensale (Abrams et al., 1963 ; Lesher et al., 1964). Ce phénomène n'est pas clairement expliqué à ce jour mais pourrait être dû à une diminution par les métabolites fermentaires toxiques (comme l'ammoniaque) de la durée de vie des entérocytes (Vissek, 1978a).

### **III-4. Pathologies digestives du veau d'origine bactérienne**

Dans certaines conditions, telles qu'un changement brutal de régime alimentaire, l'utilisation d'antibiotiques thérapeutiques ou des situations de stress (séparation de la mère par exemple), la flore installée dans le tube digestif des animaux peut être fortement perturbée et des espèces exogènes indésirables peuvent alors émerger et conduire à des troubles digestifs (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007).

L'ensemble des travaux montre que la mortalité chez les veaux survient principalement dans les quinze premiers jours de vie et qu'elle fait suite, dans la majorité des cas, à des troubles gastro-intestinaux. Ces troubles peuvent avoir des origines différentes, infectieuse (virale ou bactérienne) ou non infectieuse (métabolique), sans qu'il soit toujours facile de les séparer, de définir leur interaction ou de préciser l'antériorité de l'une par rapport à l'autre.

Les troubles gastro-intestinaux d'origine bactérienne peuvent être en rapport avec une liste de microorganismes non exhaustive. A côté de genres mineurs comme *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Proteus* et *Pseudomonas* dont

l'action peut correspondre à une localisation intestinale d'une affection généralisée, nous ne retiendrons que *Cl. perfringens* et *E. coli* comme principaux responsables de gastro-entérites chez le veau (Renault et al., 1977).

#### III-4.1 Entérotoxémie bovine

Le terme d'entérotoxémie définit une pathologie le plus fréquemment aigüe, voire sur aigüe, caractérisée par la résorption dans la circulation sanguine de toxines élaborées dans l'intestin. Leur production fait suite à une prolifération dans l'intestin, dans des circonstances souvent mal connues, de la bactérie les produisant (Renault et al., 1977).

L'entérotoxémie du veau est une affection fatale, qui a d'importantes répercussions chez la race Blanc-Bleu-Belge. D'autres races bovines y sont également sensibles, mais de manière moins spectaculaire. En 2003, 90 % des veaux atteints d'entérotoxémie étaient de race Blanc-Bleu-Belge et âgés de 2 à 4 mois. Beaucoup plus rarement, des animaux à l'engrais (4%) ou des animaux adultes (2,5%) sont touchés. Le système allaitant, les rations riches en aliment concentré et pauvres en fibres ou encore la mise à la pâture à une époque où l'herbe est riche en protéines solubles sont des facteurs favorisant (Manteca, 2003).

Le plus fréquemment, l'animal est trouvé mort ou comateux sans signe précurseur. C'est pourquoi, l'entérotoxémie bovine est aussi régulièrement qualifiée de « mort subite ». Les signes cliniques sont des coliques, parfois accompagnées de troubles nerveux et rapidement suivies de coma et de mort. La diarrhée, hémorragique ou non, et le météorisme sont rares. Sans intervention, la mort apparaît en 2 heures environ. Dans 67% des cas, on relève, 24 à 36 heures avant, l'existence de conditions stressantes, majoritairement de nature alimentaire (Manteca, 2003).

Le cadavre montre un embonpoint normal, voire excellent. Lors de l'autopsie, l'intestin est souvent dilaté par les gaz et les lésions consistent dans 90% des cas en une

jéjuno-iléite aigüe nécro-hémorragique, avec un contenu intestinal le plus souvent liquide, hémorragique et abondant (Manteca, 2003).

Histologiquement, la nécrose de la muqueuse intestinale se déroule en trois étapes : tout d'abord, le sommet des villosités est nécrosé, aboutissant à une intense hémorragie intra-luminale ; ensuite, les cellules épithéliales bordant l'axe des villosités sont atteintes ; et l'axe conjonctivo-vasculaire est finalement nécrosé. Les bactéries ne pénètrent que de manière très limitée dans la paroi intestinale (Manteca, 2003).

Depuis très longtemps, *Cl. perfringens* a été tenu pour responsable de cette affection clinique, bien que d'autres espèces du genre *Clostridium* aient aussi été mis en cause, dont *Cl. sordellii* (Renault et al., 1977). En comparant des lots de veaux sains et de veaux atteints d'entérotoxémie (Manteca, 2003), il est apparu que *Cl. perfringens* et *Cl. sordellii* étaient plus fréquemment isolés dans le contenu intestinal des animaux malades comparativement aux veaux sains (79 vs 19 %, 20 vs 5%, respectivement). De plus, des concentrations significativement plus élevées de *Cl. perfringens* ont été mesurées au niveau des lésions des animaux atteints (environ 7 log (UFC/mL de contenu)) par rapport à celles observées sur les mêmes régions d'animaux témoins (4 à 5 log (UFC/mL de contenu)). Par contre, les résultats de dénombrement de la flore anaérobie totale et des formes sporulées ne montraient pas de différence significative entre les deux groupes d'animaux. Toutes les souches isolées lors de cette étude chez les animaux malades ont été toxinotypées et appartenaient au toxinotype A (produisant la toxine  $\alpha$ ), non entérotoxigène. La toxine  $\alpha$  n'est en effet pas reconnue comme responsable des lésions entérotoxémiques (Manteca et al., 2002). Plus que l'émergence d'une souche particulièrement virulente, il semble donc que c'est l'ensemble de la population résidente des *Cl. perfringens* qui se multiplie et concourt au développement des lésions (Manteca et al., 1999). Enfin, Manteca et al. (2002) ont également mis en évidence une prévalence significativement supérieure du gène de la toxine  $\beta_2$  chez les souches de *Cl. perfringens* isolées de veaux malades par rapport à celles isolées chez les veaux sains. Ils ont donc étudié le rôle de cette toxine dans l'entérotoxémie bovine et ont trouvé que les toxines

$\alpha$  et  $\beta 2$  ont un rôle synergique dans la production des lésions nécrotiques et hémorragiques de l'intestin grêle. Cette implication serait vraisemblablement liée à une mutation du gène *cpb2* du génome de *Cl. perfringens* (Lebrun et al., 2007).

#### III-4.2 Infections à *E. coli* ou colibacillooses

Deux formes de colibacillooses existent chez le veau : la forme septicémique et la forme diarrhéique, qui sera plus détaillée dans ce chapitre. Toutes deux sont dues à une prolifération d'*E. coli*.

La forme septicémique entraîne une mort rapide de l'animal en 72 heures, accompagnée ou non de diarrhée. Elle est due à une invasion extra-intestinale de l'organisme par des colibacilles invasifs et à leur prolifération dans le sang et divers organes.

Deux formes diarrhéiques existent (Barron, 2002) :

- la forme entérot toxique, due à des souches entérot oxinogènes, qui se traduit, après une période d'adynamie, par une diarrhée très liquide, de couleur jaune paille, de l'inappétence et une température voisine de 39°C. La déshydratation et l'acidose prennent rapidement un caractère de gravité et, en absence de thérapeutique, l'évolution vers la mort se fait en 1 à 4 jours.

- une forme entérique, due à des souches non entérot oxinogènes, pouvant entraîner la mort en 2 à 8 jours. Elle se traduit par une diarrhée blanche plus ou moins sévère. Une déshydratation trop importante peut aussi entraîner la mort de l'animal.

Les facteurs augmentant le risque d'infection par *E. coli* chez le veau sont en particulier liés à la mère.

Tout d'abord, il a été établi que la présence chez la mère d'infections diverses est corrélée à un risque élevé pour le veau, puisque d'une part, la qualité du colostrum diminue, et d'autre part, le risque de contamination par des germes pathogènes de la vache au veau est augmenté (Larvor, 1980). De plus, des carences nutritionnelles chez la mère, en particulier en vitamine A, sont des facteurs de risque importants (Fey et al., 1962 ; Larvor, 1980).

Cependant, la qualité du colostrum reste le facteur le plus important. En effet, le colostrum contient des anticorps contre l'antigène K de la souche infectant d'*E. coli*. Or, il a été démontré que des veaux ayant succombé à une infection colibacillaire avaient reçu un colostrum dépourvu de ces anticorps (Ingram et al., 1957).

Enfin, il est apparu que le veau mâle est deux fois plus touché que le veau femelle (Serieys, 1993).

#### *III-4.2.1 Souches entérotoxinogènes (ETEC)*

Les souches entérotoxinogènes sont à l'origine des entérotoxémies. Deux caractéristiques des *E. coli* sont propres à la forme entérotoxinogène : la présence de l'antigène K99, responsable de l'attachement des bactéries à la muqueuse intestinale de l'hôte et la production de deux exotoxines dites entérotoxines, une thermolabile et une autre thermostable (Barron, 2002).

L'attachement des bactéries aux microvillosités des entérocytes conduit rapidement à une colonisation de l'intestin. Cette dernière débute à la jonction iléo-caecale, s'étend à l'ileon puis au jéjunum. Des concentrations d'*E. coli* de  $10^9$  à  $10^{10}$  UFC/mL de contenu intestinal ont été mesurées chez les veaux atteints, alors que les valeurs usuelles de dénombrement sont voisines de  $10^6$  UFC/mL (Schelcher et al., 1993). L'attachement des bactéries n'a pas de rôle propre dans la maladie, mais elle permet une libération des entérotoxines à proximité des récepteurs membranaires. Les toxines thermostable et thermolabile, induisent alors une sécrétion d'eau et d'électrolytes du sang vers la lumière intestinale causant la diarrhée (Dubourguier et al., 1980), via une action sur l'entérocyte, par l'intermédiaire de la guanylate-cyclase et du GMP cyclique pour la toxine thermostable, et par l'intermédiaire de l'adénylcyclase et de l'AMP cyclique pour la toxine thermolabile.

### III-4.2.2 Souches non entérotoxinogènes

Les souches non entérotoxinogènes sont à l'origine des entérites chez le veau. Deux types de bactéries en sont la cause : les bactéries entéropathogènes (EPEC) et les bactéries entérohémorragiques (EHEC). Ces deux types de bactéries sont caractérisés d'« attaching and effacing *E. coli*» (AEEC) pour décrire la lésion intestinale particulière qu'elles induisent. En effet, ces bactéries « effacent » les villosités intestinales et s'attachent de façon intime à la membrane cytoplasmique des entérocytes (Stordeur et al., 2000). La différence entre les deux types d'AEEC réside dans leur production de toxines puisque les EPEC n'en produisent pas alors que les EHEC sécrètent des vérotoxines, encore nommées shiga-toxines, actives sur diverses cellules épithéliales (Mainil et al., 1987 ; Milon et al., 1999 ; Nataro et Kaper, 1998). C'est pourquoi les souches EHEC sont encore nommées vérotoxinogènes ou shiga toxinogènes.

La microflore intestinale des animaux peut être considérée comme un organe à part entière. En effet, elle est en constante interaction avec l'hôte, engendrant des avantages et des inconvénients. En effet, elle fournit à l'hôte des nutriments spécifiques, mais en contrepartie elle consomme une partie de son alimentation et produit certaines substances toxiques pour l'organisme. De plus, cette flore est utile au développement du système immunitaire de l'animal, mais en retour, elle place l'hôte en situation d'inflammation permanente, le forçant à sécréter du mucus en grande quantité et à renouveler son épithélium intestinal à un taux élevé. Toutes ces contraintes entraînent un coût énergétique important pour l'animal. De plus, lorsque l'équilibre de la microflore commensale est perturbé, des pathologies gastro-intestinales graves peuvent survenir, comme celles dues à *Cl. perfringens* et *E. coli*, souvent mortelles. C'est pourquoi, il est crucial de mettre au point des additifs alimentaires pour les animaux, permettant d'orienter le métabolisme microbien vers une économie d'énergie maximale, et de maintenir l'équilibre de la microflore afin de réduire au maximum l'apparition des pathologies. Les AFCs utilisés précédemment apportaient ces avantages.

## CHAPITRE IV :

### LA MODELISATION DE L'ECOSYSTEME INTESTINAL

---

Des systèmes de modélisation ont été mis au point pour l'étude de la microflore intestinale humaine. En effet, les difficultés d'accessibilité du tractus digestif et les nombreux problèmes éthiques engendrés par les expérimentations chez l'homme constituaient des obstacles à l'étude de l'écosystème intestinal. Aussi, différents modèles d'étude, *in vivo* et *in vitro*, du tractus gastro-intestinal humain ou animal ont été proposés. Dans ce chapitre, des modèles de l'écosystème intestinal, humain ou animal seront présentés afin d'avoir une vue globale des différents systèmes existants. Les modèles *in vivo* seront brièvement rapportés et divers modèles *in vitro* seront présentés plus en détail avec leurs caractéristiques particulières. Des applications dans le domaine du « screening » des additifs alimentaires pouvant remplacer les AFCs seront exposées.

Le Tableau 6 récapitule les avantages et les inconvénients des différents modèles pouvant servir à l'étude de l'écosystème intestinal (Rumney et Rowland, 1992).

#### IV-1. Modèles *in vivo*

Chez le veau, il est difficile d'étudier le microbiote intestinal *in vivo*. En effet, les contraintes d'expérimentation sont importantes : nécessité d'un grand espace de stockage, coût très élevé. Afin de contourner ces difficultés, il est possible de réaliser des recherches chez des animaux de laboratoire modèles, en général des rongeurs mais aussi depuis quelques années des porcs. Ainsi, les mécanismes écologiques et le métabolisme du microbiote intestinal de ces animaux modèles ont pu être étudiés dans leur globalité. Cependant, la microflore intestinale est de nature différente selon les espèces hôtes. Les corrélations entre les résultats obtenus avec les animaux de laboratoire et le sujet de l'étude (ici le veau) sont donc très difficiles.



C'est pourquoi des optimisations ont été apportées aux modèles animaux. Tout d'abord, des animaux axéniques, c'est-à-dire dépourvu de toute flore, ont été étudiés. Ces recherches ont permis un éclairage sur les avantages et inconvénients conférés à l'hôte par la microflore. Ces animaux axéniques ont ensuite été inoculés avec un ou plusieurs microorganismes issus de l'animal choisi pour l'étude. Ce sont les animaux gnotobiotiques ou animaux à flore contrôlée. En général, soit les germes ont été isolés de fèces ou de contenu intestinal, soit ils proviennent de banques. Cependant, cette méthode restreint l'étude à l'interaction entre quelques microorganismes et elle ne permet pas une vue de l'écosystème global. C'est pourquoi les animaux axéniques ont aussi été inoculés avec la totalité des fèces ou du contenu intestinal de l'animal à étudier. Ainsi, la microflore étudiée correspond à l'animal d'étude et non à l'animal modèle et la corrélation avec la réalité est beaucoup plus facile. Dans ces conditions, la microflore maintient ses caractéristiques bactériologiques et enzymatiques comme l'ont démontré (Mallett et al., 1988) lors de l'inoculation de rats axéniques avec des suspensions fécales humaines. Les activités enzymatiques mesurées dans les fèces humaines étaient statistiquement similaires à celles mesurées dans le caecum des rats gnotobiotiques, mais par contre statistiquement différentes des activités mesurées dans les rats conventionnels (Mallett et al., 1987). Les corrélations ne sont évidemment pas parfaites puisque la physiologie intestinale de l'animal modèle ne peut être identique à celle de l'animal d'étude. Cependant, les animaux gnotobiotiques facilitent, en particulier, l'étude des interactions entre l'alimentation et la microflore intestinale.

#### IV-2. Modèles *in vitro*

Il existe de très nombreux modèles *in vitro* reproduisant l'écosystème intestinal. Ils peuvent être statiques ou dynamiques, uni ou multi-compartmentaux. Tous comportent un nombre limité de paramètres simulés et sont dédiés le plus souvent à un type particulier d'études.

Il n'est pas possible de définir un modèle *in vitro* « idéal », chacun étant par définition un « modèle » et possédant donc ses limites. L'objet de ce paragraphe est donc d'exposer les principales caractéristiques des différents types de fermenteurs, en détaillant leurs avantages et leurs inconvénients, permettant de faire un choix selon l'objectif de l'étude.

#### IV-2.1 Systèmes « batch »

De nombreuses études sur la microflore intestinale ont été réalisées en batch, c'est à dire dans des bouteilles hermétiques contenant des suspensions de contenu intestinal dans un tampon ou un milieu de culture sous atmosphère anaérobie, sans entrée ni sortie. Les bouteilles sont incubées sous agitation douce à la température souhaitée. Cette méthode est très pratique et très peu coûteuse. Elle permet de tester un grand nombre de substrats avec de nombreux échantillons intestinaux différents, afin d'obtenir des résultats les plus cohérents possibles. Cependant, elle n'est utilisable que pour des périodes d'incubation très courtes (jusqu'à 72h) puisque les conditions biotiques et abiotiques des cultures sont en perpétuel changement, avec des changements de pH, de potentiel rédox, de concentrations en substrats et en produits de fermentation, entraînant la sélection et la disparition de certaines populations bactériennes. Cette technique a été très largement utilisée pour étudier le métabolisme fermentaire du chyme intestinal, par l'ajout de substrats spécifiques et par mesure des produits de fermentation en fin de culture. Les analyses concernent les gaz produits, les AGCC, le lactate et l'ammoniaque, ainsi que les évolutions du pH ou bien les changements de concentration de la microflore. Le plus souvent, ces études sont faites comparativement à un témoin pour éliminer les biais dus aux changements de la culture en système clos.

Dans cette synthèse bibliographique, un intérêt particulier a été porté aux applications visant le développement d'alternatives possibles aux AFCs (Tableau 7). En culture batch, plusieurs études ont été réalisées.

Tout d'abord, des acidifiants ont été testés dans du contenu caecal de porcs (Piva et Grilli, 2007). Ces acides, benzoïque, lactique et sorbique, ont été incubés avec du contenu caecal et un milieu nutritif pendant 24 heures. Il a été montré que l'acide benzoïque provoquait une diminution du volume de gaz produit comparativement à la fermentation contrôlée sans additif. L'acide lactique, au contraire, a conduit à une augmentation de ce volume de gaz, ainsi qu'à une augmentation de la concentration en ammoniacque : il pouvait donc être considéré comme un substrat favorisant la fermentation. L'acide sorbique n'a, pour sa part, entraîné aucune modification significative pour ces deux paramètres.

Des prébiotiques ont également été étudiés dans des systèmes batch. En 2007, Donalson et al. ont utilisé un pool des contenus cécaux de trois poules, cultivé en batch pendant 48 heures avec une souche de *Salmonella Typhimurium*, pathogène colonisant fréquemment le côlon des volailles. Il a été observé que l'ajout de fructooligosaccharide inhibait la croissance du pathogène de façon significative.

Enfin, des extraits végétaux ont également été testés en culture batch (Busquet et al., 2006). Douze extraits de plantes et 6 sous-produits de ces extraits ont été incubés pendant 24 heures avec du fluide ruminal. Les résultats obtenus, concernant la modification des profils en AGCC et de la concentration en ammoniacque, démontrant qu'une sélection et une combinaison judicieuse de ces extraits végétaux pourrait permettre d'orienter le métabolisme d'une microflore donnée.

<p>Les systèmes de culture en batch permettent d'obtenir des informations précieuses, en particulier d'ordre métabolique. Ils constituent de bonnes méthodes de « pré-screening » mais ne permettent pas d'études sur le long terme car les conditions de culture évoluent trop vite. C'est pourquoi des systèmes semi-continus et continus ont été développés.</p>
---

#### IV-2.2 Systèmes semi-continus

Le premier système *in vitro* semi-continu modélisant la microflore colique humaine a été mis au point par Miller et Wolin en 1981. Beaucoup de chercheurs ont, par la suite, adapté ce modèle à leurs travaux. Miller et Wolin avaient eux-mêmes mis au point leur modèle à partir d'un système continu permettant l'étude de l'écologie du rumen (Slyter et al., 1964). Le système de Miller et Wolin a été développé dans le but de maintenir la microflore colique humaine *in vitro* sur le long terme et de mimer l'entrée périodique des substrats fermentescibles dans le côlon.

Dans un système semi-continu, du milieu nutritif est apporté au fermenteur de façon régulière, de 1 à 24 fois par jour. De la même façon, du milieu fermentaire est prélevé, en quantité équivalente, juste avant ou pendant l'apport de milieu nutritif. Cet apport fractionné en milieu nutritif est la caractéristique des systèmes semi-continus. Ce renouvellement permanent du milieu nutritif évite la limitation en substrats du système et le prélèvement simultané du milieu fermentaire limite l'accumulation des produits de fermentation pouvant inhiber la croissance bactérienne. Ces caractéristiques ont pour but d'établir et de maintenir dans les modèles une microflore complexe sur de longues durées. Le milieu nutritif utilisé dans les systèmes de fermentation semi-continus est un milieu complexe, mis au point afin de reproduire la composition du chyme. Macfarlane et al. (1998) ont mis au point un milieu nutritif très complexe représentant le chyme iléal arrivant au côlon humain, milieu largement réutilisé par la suite.

A titre d'exemple, la Figure 12 montre un schéma du système semi-continu développé par Miller et Wolin. Le système est constitué d'un réacteur maintenu sous agitation à 37 °C grâce à un bain-marie et équipé de ports permettant l'échantillonnage, l'addition de milieu nutritif et le prélèvement de milieu fermentaire. Après inoculation du système avec des fèces humaines, le modèle est rempli de diazote avant d'être fermé hermétiquement afin de créer une atmosphère anaérobie. Le système est incubé en mode « batch » pendant 18 heures avant l'apport de milieu nutritif. Le régime semi-continu est contrôlé par des minuteurs, enclanchant le retrait de 200 mL de milieu fermentaire puis l'apport de 200 mL de milieu nutritif, toutes les 12 heures (Miller et Wolin, 1981). Lors

d'une première étude, la fermentation a été maintenue pendant 33 jours. La production en AGCC et en gaz dans le système était similaire à celle mesurée *in vivo* mais les concentrations des groupes microbiens dénombrés étaient inférieures à celles mesurées dans les fèces, ce que les auteurs expliquent par le taux de dilution des fèces. Ce système a été amélioré par la suite en ajoutant une électrode pH et des pompes permettant l'ajout de base ou d'acide afin de maintenir le pH constant, et en ajoutant également une électrode supplémentaire pour la mesure du potentiel d'oxydoréduction (Edwards et al., 1985).

Ces systèmes *in vitro* semi-continus simulant l'écosystème intestinal d'animaux ont été utilisés pour tester différents additifs alimentaires (Tableau 7).

En particulier, Lopez et al. (1999) ont utilisé ce type de système afin de déterminer les effets à long terme du fumarate (additif faisant partie de la catégorie des acidifiants) sur la fermentation et la production en méthane de la microflore du rumen du mouton. L'inoculum était constitué d'un pool du contenu du rumen de 3 animaux. La fermentation s'est déroulée pendant 26 jours avec un apport de milieu nutritif une fois par jour. Afin d'avoir une vision globale de l'écosystème, les paramètres mesurés étaient variés : production totale de gaz, production de CH<sub>4</sub> et d'H<sub>2</sub>, concentrations en AGCC et en ammoniacque et énumération des bactéries totales, des bactéries cellulolytiques, des protozoaires et des archées méthanogènes. Il est apparu que le fumarate pourrait être un additif intéressant dans l'alimentation des moutons, puisqu'il réduit la quantité de CH<sub>4</sub> produite à partir du H<sub>2</sub> et stimule la prolifération des bactéries cellulolytiques et donc la digestion des fibres.

En 2001, Bender et al. (2001) ont étudié les effets spécifiques de la vancomycine et de la métronidazole sur la production d'AGCC dans le côlon de porc grâce à un système *in vitro* semi-continu (Cositec, Breves et al., 1991). Ils ont montré que la vancomycine entraînait une diminution de la production des AGCC totaux de 1 mmol/jour, de l'acétate de 0,7 mmol/jour et du butyrate de 0,3 mmol/jour. La métronidazole a permis l'obtention de résultats similaires. Cette étude a donc montré que ces deux substances peuvent influencer la fermentation colique du porc, confirmant l'hypothèse que les AFCs influencent bien la microflore intestinale et son métabolisme.

Les systèmes semi-continus permettent d'obtenir des informations sur l'évolution du métabolisme d'un écosystème intestinal sur le long terme. Ils miment également l'apport fractionné d'aliment que l'on peut observer *in vivo*. Cependant, cet apport fractionné est typique du régime alimentaire humain. Il n'existe chez l'animal d'élevage que dans le cas où celui-ci n'est pas nourri *ad libitum*. De plus, cet apport fractionné de milieu nutritif dans le système de fermentation *in vitro* crée un état instable permanent dû au changement des conditions de l'écosystème provoqué à chaque apport de milieu. C'est pourquoi des systèmes de modélisation *in vitro* continus ont été développés et plus largement utilisés.

#### IV-2.3 Systèmes continus

Parallèlement aux systèmes semi-continus, des modèles de culture continue de la microflore ont été développés. Ces derniers systèmes se distinguent des précédents par le fait que la microflore est maintenue à un état stable par l'addition continue et non fractionnée de milieu nutritif et le prélèvement continu de milieu fermentaire.

Les systèmes de fermentation continus présentent une complexité très variable, allant du simple réacteur à trois réacteurs reliés en série. Le fermenteur continu à simple réacteur fonctionne de façon similaire aux systèmes semi-continus présentés ci-dessus, permettant notamment une régulation de pH et un maintien de la température à une valeur constante. Les systèmes multicompartimentaux présentent des paramètres propres à chaque réacteur, qui modélisent chacun un compartiment intestinal précis (exemple : côlon ascendant, côlon transverse et côlon descendant).

Un système illustrant bien les fermenteurs continus est celui mis au point par Macfarlane en 1998 (Figure 13), dans le but de modéliser les conditions nutritionnelles et environnementales du côlon humain. Il est constitué de 3 réacteurs associés en série, représentant respectivement le côlon ascendant, le côlon transverse et le côlon descendant. La température de l'ensemble est fixée à 37 °C et le pH est maintenu à 5,5, 6,2

et 6,8 dans les réacteurs 1 à 3 respectivement, afin de reproduire les valeurs mesurées dans les trois compartiments *in vivo*. Chacun des réacteurs est inoculé avec 100 mL de fèces d'un volontaire diluées à 20 %. Le système est tout d'abord soumis à une nuit de mode « batch » afin d'« équilibrer » la microflore, puis du milieu nutritif est apporté en continu au premier réacteur. Le volume de chaque réacteur reste constant grâce à un port placé sur le côté du réacteur, entraînant la sortie du milieu fermentaire dès dépassement du niveau fixé. Cette sortie du réacteur 1 apporte le milieu fermentaire au réacteur 2, qui apportera ensuite le milieu au réacteur 3. Evidemment, à chaque fois que le milieu fermentaire passe dans un réacteur, la microflore utilise les nutriments et donc le milieu s'appauvrit. Quatorze jours sont nécessaires à la stabilisation de l'écosystème (état stable déterminé grâce à la mesure des AGCC) avant de faire des analyses.

Des systèmes continus encore plus complets existent. Un modèle en particulier a retenu notre attention. Il s'agit en effet d'un système continu, amélioré grâce à la mise au point d'un système de fixation de la microflore sur des microbilles, permettant i) de simuler la microflore qui adhère à la muqueuse digestive *in vivo*, et ii) de maintenir la biodiversité de l'écosystème modélisé, qui est en partie perdue par lessivage dans les modèles classiques. Cinquin et al. (2004) ont en effet réussi à immobiliser la microflore fécale de nouveaux-nés dans des billes de gel, qui constituent l'inoculum du fermenteur continu. Il est apparu que ces billes de gelensemencent le milieu fermentaire en continu avec la microflore immobilisée, permettant l'obtention d'un état microbiologique stable pouvant être maintenu jusqu'à 54 jours. L'équipe a prouvé, par technique moléculaire (FISH et DGGE, Cinquin et al., 2006), que cette technique d'immobilisation de la microflore préservait la diversité de l'inoculum fécal. Cette technique est très prometteuse, en particulier dans l'objectif de tester plusieurs conditions ou traitements de façon successive.

Dans l'objectif d'étudier différents additifs alimentaires pouvant remplacer les AFCs chez les animaux, c'est le système continu uni-compartmental qui a été le plus utilisé.

Par exemple (Tableau 7), Sakata et al. (2003) se sont servis de ce type de modèle, inoculé avec un pool des contenus cécaux de 5 porcs, pour déterminer l'impact de 4 préparations de probiotiques différentes, sur le taux de production d'AGCC et d'ammoniaque. Cette étude de 6 jours, dont les deux premiers étaient réservés à la stabilisation de la microflore, a permis de montrer que les quatre mélanges de probiotiques utilisés augmentent la production d'AGCC, d'acide succinique et d'acide lactique sans changer le ratio entre ces acides, et diminuent la production en ammoniaque.

Busquet et al. (2005) ont également utilisé un système continu à un réacteur, inoculé avec un pool de contenu du rumen de 2 génisses, afin de comparer l'impact du cinnamaldéhyde et de l'huile d'ail, comparativement à celui du monensine sodium (AFC) sur la fermentation du rumen. Cette étude a été réalisée sur 9 jours (dont 6 jours de stabilisation). Les auteurs ont mesuré les AGCC tout au long de la fermentation et leur concentration étant stable dès le deuxième jour, ils ont estimé que 2 jours de stabilisation étaient nécessaires pour l'adaptation de la microflore du rumen. Les deux extraits de plante ont entraîné, comme l'AFC, une modification dans le ratio des différents AGCC produits. Cependant, les additifs ont conduit à une augmentation de la proportion en butyrate alors que l'AFC la diminuait. Il est donc vraisemblable que les extraits de plante aient un mode d'action différent de celui de l'AFC testé.

Les systèmes continus de modélisation de l'écosystème intestinal permettent l'obtention d'un état stable de la microflore, après un temps de stabilisation plus ou moins long. Après obtention de cette stabilité, ils permettent d'étudier la microflore à long terme et même de tester plusieurs traitements successivement. Cependant, ces systèmes *in vitro* ne miment pas les conditions dynamiques observées *in vivo*, telles que le péristaltisme ou le transit du chyme. Afin de s'approcher le plus possible des conditions *in vivo*, des modèles plus dynamiques ont donc été mis au point ces dernières années.



#### IV-2.4 Systèmes dynamiques

Les systèmes TIM (TNO gastro-Intestinal Model) sont des modèles *in vitro* dynamiques qui permettent une simulation des processus physiologiques de l'environnement intestinal humain. Deux modèles ont été mis au point, le modèle TIM1 (Figure 14) reproduisant l'estomac et les trois segments de l'intestin grêle, et le modèle TIM2 (Figure 15) reproduisant les trois segments du côlon (Blanquet et al., 2004 ; Minekus et al., 1999). Ces systèmes, contrôlés par informatique, permettent de reproduire en fonction des données *in vivo*, les principaux paramètres de la digestion (Tableau 8) tels que le pH, la température corporelle, mais aussi le brassage du chyme, les sécrétions gastriques, biliaires et pancréatiques, l'absorption passive de petites molécules (comme les AGCC ou autres produits de fermentation) et d'eau, ainsi que l'activité microbienne.

Ces systèmes n'ont pour le moment pas été utilisés pour cribler des additifs alimentaires dans l'objectif de remplacer les AFCs chez l'animal. Cependant, Meunier et al. (2007) ont étudié, dans le système TIM1 paramétré pour simuler l'environnement gastro-intestinal du porc, le devenir d'une forme galénique contenant de l'oléorésine de capsicum, extrait d'huile essentielle pouvant remplacer les AFCs. Les systèmes TIM ont de plus été largement validés chez l'homme afin, par exemple, de déterminer la survie de bactéries probiotiques dans l'écosystème intestinal (Blanquet et al., 2004 ; Marteau et al., 1997) ou d'étudier l'activité de la microflore colique (Krul et al., 2002).

<p>Les systèmes dynamiques tels que le TIM permettent à ce jour une modélisation plus proche des conditions <i>in vivo</i>. Cependant, ces modèles présentent encore certaines limites. En particulier, ils ne simulent pas l'ensemble des interactions hôte-microflore observées chez l'homme ou chez l'animal (comme par exemple les interactions avec le système immunitaire).</p>
---

En résumé, de nombreux modèles ont été mis au point afin de limiter l'expérimentation animale. Par définition, ces outils ne sont que des modèles, avec chacun leurs limites. Le choix entre tous ces modèles est donc difficile et doit se faire en fonction de l'objectif de l'étude. Une étude à court terme privilégiera un modèle « batch », alors qu'une étude sur le long terme se tournera plus vers un système semi-continu ou continu. Le mode semi-continu sera privilégié lorsque l'apport fractionné de l'aliment peut influencer la population microbienne alors que les systèmes continus seront choisis dans le cas où l'on recherche un état stable de la microflore. Enfin, un système dynamique devra être utilisé lorsque les paramètres dynamiques de la lumière intestinale de l'hôte peuvent fortement influencer les résultats. Dans tous les cas, les différents paramètres introduits dans les modèles doivent être adaptés au type d'étude, chez l'homme ou l'animal étudié, afin de mimer au mieux les conditions *in vivo*.

# PARTIE EXPERIMENTALE

# **CHAPITRE I**

**DENOMBREMENT DES PRINCIPAUX GROUPEs BACTERIENS  
CULTIVABLES ET CARACTERISATION DE CERTAINS  
PARAMETRES ABIOTIQUES DU CONTENU JEJUNO-ILEAL  
DES VEAUX DE BOUCHERIE**

## CHAPITRE I :

### DENOMBREMENT DES PRINCIPAUX GROUPEs BACTERIENS CULTIVABLES ET CARACTERISATION DE CERTAINS PARAMETRES ABIOTIQUES DU CONTENU JEJUNO-ILEAL DES VEAUX DE BOUCHERIE (ARTICLE 1)

---

#### CONTEXTE ET OBJECTIFS

Bien que les données bibliographiques soient peu nombreuses, il n'en demeure pas moins que le mode d'action des antibiotiques utilisés jusque-là comme facteurs de croissance semble fortement influencé par la nature de la microflore intestinale des animaux et son équilibre.

Afin de pouvoir tester divers candidats au remplacement des AFCs en fonction de leur action sur la microflore, la mise au point d'un outil de fermentation *in vitro* permettant le screening de plusieurs additifs s'avérerait indispensable. Avant toute mise au point de cet outil, la connaissance de l'écosystème intestinal du veau était donc obligatoire.

Comme très peu de données étaient disponibles dans la littérature, et la majorité d'entre elles rendue obsolète en raison des évolutions des techniques d'élevage, le premier objectif de ces travaux de doctorat a consisté à caractériser *in vivo* les principaux groupes bactériens cultivables présents dans le contenu jéjuno-iléal des veaux de boucherie, et à évaluer un certain nombre de paramètres abiotiques caractérisant cet écosystème. Afin de déterminer le moment le plus opportun pour étudier cet écosystème, une étude comparative a été réalisée en fonction du temps de jeûne des animaux.

Le compartiment jéjuno-iléal a été plus particulièrement étudié car il s'agit du principal lieu de déclenchement des pathologies gastro-intestinales du veau.

Quatre, 6 et 12 veaux de boucherie de race Prim'Holstein ont été abattus respectivement après 24, 12 et 6 heures de jeûne et leurs contenus intestinaux ont été

prélevés dans les 5 minutes suivant l'abattage. Les paramètres pH et potentiel d'oxydoréduction ont été mesurés immédiatement.

Après transfert au laboratoire, les groupes bactériens suivants ont été dénombrés, par culture sur milieux gélosés sélectifs : flore anaérobie totale, flore utilisatrice de lactate, *Bacteroides*, Lactobacilles, Entérocoques, Bifidobactéries, *Escherichia coli* et *Clostridium perfringens*.

De plus, ont été déterminées les concentrations en métabolites fermentaires : L-lactate, ammoniacque, acétate, propionate, butyrate, isobutyrate, valérate et isovalérate.

Enfin, la composition biochimique des échantillons a été analysée chez les animaux ayant subi 6 heures de jeûne, puisque seuls les contenus intestinaux de ces veaux avaient un volume suffisant. Les principaux composants quantifiés étaient : teneur en glucose et galactose sur échantillons bruts et échantillons hydrolysés, teneur en fibres, en protéines, en lipides, en minéraux, profil des acides gras et des acides aminés.

## **MÉTHODES ET RÉSULTATS**

### **Article 1**

#### **Enumeration of some cultivable bacterial groups and characterization of some abiotic parameters in the jejunoileal content of Prim'Holstein veal calves**

Running title: Jejunoileal content of veal calves

**M. Gérard-Champod<sup>‡</sup>, S. Blanquet-Diot<sup>†</sup>, L. Mazuranok<sup>‡</sup>, M. Alric<sup>1</sup>.**

<sup>†</sup>Equipe de Recherche Technologique « Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament », Faculté de Pharmacie, Université Clermont-Ferrand I, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, Institut Fédératif de Recherche Santé 79, 28 place Henri Dunant, 63 001 Clermont-Ferrand, France.

<sup>‡</sup>PANCOSMA SA, Voie-des-Traz 6, C.P. 143, CH-1218 Le Grand-Saconnex, Switzerland.

<sup>1</sup>Corresponding author: [Monique.Alric@u-clermont1.fr](mailto:Monique.Alric@u-clermont1.fr), phone number: + 33 (0) 4 73 17 79 52; fax number: + 33 (0) 4 73 17 83 92.

## ABSTRACT

A study was conducted to characterize the bacterial and biochemical composition of the jejunoileal content of veal calves and the effect of pre-slaughter fasting time. At 22 weeks of age, 22 pre-ruminant Prim'Holstein calves fed milk replacer and pellets mainly composed of corn were slaughtered at 6, 12 or 24 h after their last meal. Chyme samples were collected from the jejuno-ileal compartment just after slaughter, and pH and redox potential were immediately measured. Culture-based methods were used to determine the concentrations of total anaerobic microflora, lactate-utilizing bacteria, *Bacteroides fragilis* group, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, *Enterococci* and two potential pathogenic species, i.e. *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*. L-lactate, ammonia, and SCFA concentrations were determined on frozen samples. The biochemical composition (dry matter, total protein, lactose, galactose, glucose, minerals, amino acid profile and fatty acid profile) of the jejunoileal content was determined only on samples from the 6 h-fasted group. Microflora concentrations were significantly ( $P < 0.01$ ) greater in the 6 h-fasted group compared to the 12 and 24 h-fasted groups, involving a lower pH ( $P < 0.05$ ) and higher lactate and SCFA concentrations, both linked directly to the fermentative state of the microorganisms. The 6 h-fasted group showed the lowest inter-individual variability in bacterial group levels, except for *Cl. perfringens* which presented high inter-animal variability regardless of fasting time. At 6 h postprandial, the jejunoileal content of veal calves seemed to be in a stable state, allowing the creation of a database on its biochemical composition. This study is a key first step in the development of an in vitro system for



modeling the jejunoileal ecosystem of veal calves. This model will provide a useful tool for assessing the effects of feed additives on intestinal microflora.

**Key words:** biochemical composition, fasting time, fermentative metabolites, intestinal microflora, jejunoileum, veal calves.

## INTRODUCTION

European regulations published in January 2006 banned the use of antibiotics as growth promoters (**AGPs**) at subtherapeutic levels in animal feed (EC Regulation No. 1831/2003), particularly for veal calves. AGPs produced a significant increase in growth performances by inducing hormonal changes, enhancing intestinal immunity and increasing digestive enzymes activity, but they also acted on the fermentative metabolism of intestinal microflora, providing the animal with higher nutrient and energy availability (Corpet, 2000). Due to their action on the intestinal microflora, AGPs appeared to minimize the incidence of intestinal diseases (Kyriakis et al., 1995). The ban will certainly impact on veal calf health by leading to more frequent digestive disorders, as previously observed in pigs (Callesen, 2002) and poultry (Torney, 2002) in Denmark.

Veal calf producers are now looking for alternative feed additives to counter the consequences of the ban on AGPs. Few studies have focused on the effects of prebiotics and probiotics on growth performance and health status in veal calves (Donovan et al., 2002 ; Timmerman et al., 2005). Nevertheless, the action of feed additives on intestinal bacteria has to be assessed. An ethical and economical way to screen feed additives is to test them in an in vitro system modeling the calf's digestive tract.

Given the paucity of information on the digestive ecosystem of veal calves, this study was designed to enumerate some cultivable microbial groups and characterize the biochemical parameters of the intestinal content in veal calves. The effect of fasting time was also studied to define the kinetics of microflora growth in the chyme. This study was

performed on the jejunoileal part of the veal digestive tract where enteritis and enterotoxaemia usually occur.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Twenty-two Prim'Holstein breed calves (age =  $22.3 \pm 1.5$  weeks, mean carcass weight =  $122 \pm 10$  kg) were obtained from 4 different veal growers, rearing the calves in the same controlled conditions. They were fed a standard diet composed of i) a calf milk replacer, provided to the animals during the whole fattening period (21 weeks) at a rate ranging from 400 g to 3.5 kg of dry matter per day from the beginning to the end of fattening; and ii) pellets mainly composed of corn, provided to the calves since the third week of fattening at a rate ranging from 30 g per day, at the beginning, to 250 g per day, at the end of fattening. The studied calves received no antibiotherapy for at least the 4 weeks prior to slaughter. Four, 6 and 12 calves were slaughtered, few hours after their arrival in the slaughterhouse, and after 24, 12 and 6 h fasting, respectively. Animal housing, husbandry and slaughter conditions conformed to European Union standards. The animals were slaughtered after stunning and bleeding. The meat from the carcasses of the animals studied was fit for human consumption.

### *Sampling and sample processing*

Jejunioileal samples were collected from the intestines within 5 min post-slaughter. The intestinal content was collected from the last third of the jejunum up to a few centimeters before the end of the ileum and then homogenized, and temperature, pH and redox potential were immediately measured (EcoScan pH6, Eutech Instruments).

Bacterial enumeration was performed within the first 2 h after slaughter. Seventy mL of each jejunoileal sample were frozen (- 20°C) for metabolic and biochemical analyses.

### ***Bacterial enumeration***

Total anaerobic microflora, *Bacteroides fragilis* group, lactate-utilizing-bacteria, *Lactobacilli*, *Enterococci*, *Bifidobacteria*, *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Clostridium perfringens* (*Cl. perfringens*) were enumerated on selective solid culture media (Table 1). Serial 10-fold dilutions were done in either anaerobic, aerobic or Tryptone-Glucose-Yeast (TGY) dilution media. The anaerobic dilution medium was inoculated under CO<sub>2</sub> flow whereas the TGY dilution medium was inoculated in an anaerobic chamber. Conditions inside the chamber were maintained by using premixed gas containing 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 5% H<sub>2</sub> purchased from AirProducts, France. Anaerobiosis was monitored constantly using an oxygen analyzer (COY laboratory products) and O<sub>2</sub> level was maintained at 10 ppm or less using palladium catalysts.

All the media were inoculated in duplicate at each dilution level. For Brain Heart Infusion agar (BHI), *Bacteroides* Mineral Salt agar (BMS) and Viande Levure (VL) media, 100 µL of each serial dilution were inoculated in the anaerobic chamber using the spread-plate method. For Rogosa medium, the anaerobic dilutions were maintained under CO<sub>2</sub> flow and 1 mL of each serial dilution was inoculated using the pour-plate method. For lactate medium, the roll tubes method (Leedle et Hespell, 1980) was used to inoculate 1 mL from the same dilution tubes as the Rogosa medium. Bile Esculine Azide agar (BEA) and Beerens media were inoculated with 100 µL of the anaerobic dilution medium using the

spread-plate method in aerobic conditions. TBX agar medium (Biokar Diagnostics) was inoculated with the serial aerobic dilutions using the pour-plate method in aerobic conditions. All the media were incubated at 37°C (media, incubation conditions and times are summarized in Table 1).

Bacteria were enumerated by visual counting, taking into account media-specific selectivity (see Table 1, “Characteristics of the colonies”).

### ***Metabolic and biochemical analyses***

L-lactate, ammonia and SCFA were determined for all samples, whereas the biochemical composition of the chyme was only analyzed in the 6 h-fasted group, for which a higher amount of intestinal content was available.

***Fermentative metabolites.*** Thawed samples were placed in a water bath and brought to 80°C for 15 min to stop any enzymatic reactions, then centrifuged (9000 g, 20 min, 4°C). L-lactate and ammonia concentrations were analyzed in the supernatants using enzymatic kits (ref 10139084035 and 11112732035, Roche, R-Biopharm, respectively).

SCFA were analyzed on thawed samples that were deproteinized with mercury chloride I and then centrifuged (15000 g, 15 min, 7°C). The analyses were performed using gas chromatography (HP 6890 Series, column HP19091N-133 in polyethylene glycol 30 m x 250 µm x 0.25 µm).

***Biochemical composition of the chyme.*** The samples were first homogenized with an Ultra-Turax system. Dry matter was determined by measuring the amount of humidity in the samples and deducting it from the total weight. Humidity was measured with the

Mettler DL18 Karl Fisher Titrator using the volumetric titration method described by Karl Fisher: addition of 25 mL of methanol to 1 g of sample and water titration with KarlFisher-reagent (combititrant 5). Calibration measurements were done on water and on pure methanol.

Total nitrogen was measured on 3 g of sample via the Kjeldahl method (ISO5983). The total protein percentage was calculated by multiplying total nitrogen by the Jones factor (5.41 for the jejunoileal content of the veal calves).

AA profiles were determined on 100 to 200 mg of sample, based on protein content. Sample preparations varied according to the AA concerned. For cysteine and methionine, samples were first oxidized (performic acid 6M, 0-5°C, 16 h), then the excess performic acid was neutralized (NaOH 3M) and evaporated before a final hydrolysis step (HCl 6M, 105-110°C, 22 h). For all the other AAs except tryptophan, the samples were subjected to an acidic hydrolysis (HCl 6M, 105-110°C, 22 h), followed by alkalization (NaOH 3M to pH 2.2). The AA were analyzed using a Biochrom20 amino acid analyzer (stationary phase: acidic cation exchange resin; mobile phase: acidic Na-citrate buffers, detection after post-column derivatization with ninhydrin at 570 and 440 nm). For tryptophan analysis, the samples were subjected to alkaline hydrolysis (NaOH 4.2M, 105-110°C, 22 h), then brought to pH 7.0-9.0 with HCl 4.2M, and analyzed on a Beckman System Gold HPLC analyzer (column: allsphere C8, 250 x 4.6 mm).

Crude fiber was determined on 10 g of sample using the Fibertech System M 1020 hot extractor and the Fibertech System 1021 cold extractor (Tecator).

Lactose and galactose were measured using the Lactose/D-Galactose enzymatic kit (ref 10176303035, Roche) while glucose was measured using the D-Glucose enzymatic test-kit (ref 10716251035, Roche). Galactose and glucose were both measured on crude samples and on hydrolyzed samples to determine the amounts of these sugars that were linked to molecules such as mucin. For the hydrolysis, 5 g of sample were treated with 500 mg of pancreatine (ref 1.07130, Merck), 2.5 mL of Carrez 1 ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 85 mM) and 2.5 mL of Carrez 2 ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 250 mM) reagents, then neutralized with NaOH 1M and centrifuged (2000 g, 10 min, 7°C). The supernatants were acidified with HCl 2M and boiled with reflux for 1.5 h before a final neutralization step with NaOH 1M. One g of crude or hydrolyzed sample was mixed with 7 mL of water, 0.5 mL of Carrez 1 reagent, 0.5 mL of Carrez 2 reagent and 1 mL of NaOH 0.1M, and centrifuged (2000 g, 10 min, 7°C). The supernatants were analyzed with the enzymatic kits previously cited.

Fat content was determined on 30 g of sample. After hydrolysis (HCl 3M, 25°C, 1 h), a soxhlet extraction was performed (petroleum ether, 40-60°C, 3 h) to recover fat from the intestinal content (Bedo et al., 1976). Petroleum ether was evaporated with  $\text{N}_2$  in a water bath at 65°C until constant weight. The fatty acid composition of the samples was determined by gas chromatography (Interscience Trace GC, column: WCOT Fused Silica 25 m x 0.32 mm ID, methods ISO 5508 and ISO/TS 17764-2). The preparation and analysis of the fatty acid methyl esters was performed according to methods ISO 5509 and ISO/TS 17764-1.



Ash content was determined by drying the samples (100°C, 4 h), stirring them to break down the film, re-drying them (100°C, 1 h), stirring one more time, and a final drying step (550°C, 3 h). If ash was not fully grey, the samples were dried a final time (550°C, 1 h).

Mineral content was determined using the inductively coupled plasma method (Rader et al., 1984) with an atomic emission spectrometer (Varian Vista Pro).

### ***Statistical analyses***

Comparisons of pairs of mean values were performed using the unpaired Student's t-test of the Excel software. One-way analysis of variance was used to test for significant between-group differences. A probability level of  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

## RESULTS

### *Physiological parameters*

**pH.** The pH measured in the jejunoileal content of the three groups of calves is presented in Table 2. pH increased between 6 and 12 h postprandial ( $P = 0.005$ ) and remained stable from 12 to 24 h postprandial ( $P = 0.023$  vs. 6 h fasting and  $P > 0.1$  vs. 12 h fasting).

**Redox potential.** Redox potential was measured in the jejunoileal contents at the three fasting times (Table 2). There was no significant difference ( $P > 0.08$ ) between the three groups, and inter-individual variability appeared to be low.

### *Biochemical analyses*

**Fermentative metabolites.** Figure 1 presents the evolution of fermentative metabolites according to the fasting time of the animals. After 6 h fasting, the mean L-lactate concentration in the small intestine was high compared to longer fasting durations (20 vs. 7 mM). Total SCFA concentration decreased significantly ( $P = 0.046$ ) from 6 to 24 h postprandial. SCFA concentrations at 12 h postprandial were not significantly different from the two other groups ( $P \geq 0.07$ ). Among the SCFA measured, acetate was dominant ( $P \leq 0.04$  vs. the other SCFA, analysis not shown) in the intestinal content of calves for all the fasting groups, with percentages ranging from 83.3% (6 h) to 65.2% (24 h) of total SCFA. At 12 and 24 h fasting, isovalerate was the second most represented SCFA, corresponding to 19.0% and 26.2% of total SCFA, respectively, whereas at 6 h fasting the

second most represented SCFA was butyrate (6.6%). At all fasting times, propionate, isobutyrate and valerate were the minority SCFA, with percentages lower than 4.9% of total SCFA. We recorded a mean ammonia concentration of 7.82 mM over the different groups, with no effect of fasting time ( $P > 0.50$ ).

***Composition in micro- and macro-nutrients.*** Dry matter of the intestinal content (Figure 2,  $n = 12$ ) was composed of 52% carbohydrates, 29% proteins, 8% fat, and 11% ash. Fiber represented a very low percentage of total dry matter (0.5%). Lactose was measured at the percentage of 2.9% in the calf jejuno-ileum. Galactose and glucose were measured at low concentrations (3.3% and 1.1%, respectively) when analyzed directly on the jejuno-ileal content, whereas their concentrations reached 27.8 and 23.9%, respectively, when samples were previously treated by acidic hydrolysis. The AA profile of total proteins presented a main spike corresponding to two AA: glutamic acid and glutamine (Figure 3) and the other AA represented all between 2 and 10%. Figure 4 illustrates the fatty acid profile of the jejunoileal chyme. This profile is dominated by four fatty acids: palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1) and linoleic acid (C18:2), which range from 17% and 27% of total fat content. Other fatty acids (C12:0, C14:0, C16:1, C17:0, C18:3, C20:4 and C24:0) were detected, but in concentrations lower than 3%. Finally, sodium is the main mineral present in the jejunoileal content of calves, followed by potassium, calcium and phosphorus (Figure 5). Silicon, magnesium, zinc, iron, selenium and aluminium were also present but in low concentrations, whereas copper was not detected.

***Enumeration of the selected bacterial groups.***

At 24 h fasting (Table 3, n = 4), the mean concentration of total anaerobic microflora was 4.5 Log<sub>10</sub>(CFU/mL). The main bacterial groups in the jejuno-ileal content were *Lactobacilli* and *Enterococci* followed by *Bifidobacteria* and the *Bacteroides fragilis* group. *E. coli* and *Cl. perfringens* were present in lower mean concentrations than the other bacterial groups. Lactate-utilizing bacteria were not enumerated due to equipment problems. One of the 4 calves (V101) did not harbor any *Lactobacilli*, *Enterococci* and species of the *Bacteroides fragilis* group, meaning that its total anaerobic microflora was much lower than for the three other calves.

At 12 h fasting (Table 4, n = 6), the mean concentration of total anaerobic microflora was 6.8 Log<sub>10</sub>(CFU/mL). Lactate-utilizing bacteria reached concentrations almost as high as this figure. *Bifidobacteria* was the genus group presenting the greatest counts, followed by the *Bacteroides fragilis* group and *Lactobacilli*. Surprisingly, *Enterococci* were not found in this fasting group, and the *Bacteroides fragilis* group, *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* were not present in all the veal calves. *Cl. perfringens* was found in high concentrations compared to the other bacterial groups, whereas *E. coli* counts were still low.

At 6 h fasting (Table 5, n = 12), the mean concentration of total anaerobic microflora was 8.2 Log<sub>10</sub>(CFU/mL). Most of the bacteria were able to use lactate. The main bacterial groups present in the jejunoileal contents were *Bifidobacteria*, just ahead of *Lactobacilli*, *Enterococci* and the *Bacteroides fragilis* group. *E. coli* was present in high concentrations, whereas *Cl. perfringens* was enumerated at 3.4 logs. In this 6 h-fasted group, all the

selected bacterial groups were enumerated for all the animals, and inter-individual variability was low at an SEM close to 1 log, except for *Cl. perfringens* at 2.7 logs.

Figure 6 shows the evolution of the bacterial groups enumerated in function of the fasting time. Bacterial concentrations in 6 h-fasted animals were significantly greater for total anaerobic microflora, lactate-utilizing bacteria, *Bacteroides fragilis* group, *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* ( $P < 0.01$ ), as well as for *Enterococci* and *E. coli* ( $P < 0.001$ ), than for the two other fasting groups, except for *Cl. perfringens* which did not differ significantly ( $P > 0.08$ ) between groups. Moreover, total anaerobic microflora was present in significantly greater amounts at 12 h postprandial than 24 h ( $P < 0.001$ ). Between-individual variability in microflora composition was greater in 12 h-fasted animals than in the two other groups (Tables 3, 4 and 5).

## DISCUSSION

The objective of this work was to characterize the biochemical composition and the main cultured bacterial groups found in the jejuno-ileal content of veal calves.

A significantly lower pH was measured in the chyme of veal calves at 6h fasting compared to longer durations (Table 2). This result is consistent with those of Guilloteau et al. (1986) who reported that the pH at the terminal ileum of pre-ruminant calves increased from 7.5 (at 6 and 12 h fasting) to 8.0 (at 24 h). Smith (1962) reported no significant difference between the pH measured in the distal ileum of milk-fed calves after 2-4 h or 5-8 h fasting. These results suggest that pH does not vary during the first hours after feeding but starts rising to higher values between 6 and 12 h postprandially. pH values were lower in this trial than in that of Guilloteau et al. (1986) and Smith (1962). This may be due to the fact that the animal age and the digestive compartment studied were not exactly the same in the three studies, i.e. jejuno-ileum of 22-week-old calves in this study versus terminal ileum of 8-week-old or 2 to 20-weeks-old calves for Guilloteau and Smith, respectively. A negative redox potential of -387 mV was measured among the three fasting groups. This figure was expected given that the intestinal ecosystem is reduced by microflora-driven fermentative metabolism. Schulze et Jacob (1981) measured the redox potential of 6 to 9-week-old healthy calves over the digestive tract and found values ranging from -250 and -320 mV in the small intestine, values in the same range than those measured in this study.

We elected to measure the concentrations of L-lactate, the main SCFA, and ammonia (Figure 1) in jejunoileal content as they are the main end-products of the bacterial metabolism of proteins and carbohydrates. Previous L-lactate measurements performed in calves have only focused on the faeces, and the concentrations were always much lower than those recorded in the present trial:  $1.2 \pm 2.9$  mM for 60-day-old calves (Shimomura et Sato, 2006),  $1.6 \pm 0.1$  mM for 45-day-old calves (Omole et al., 2001) or 5.1 mM for 21-day-old calves (Ewaschuk et al., 2004), vs. 7 to 20 mM in the present study. Mirroring the patterns in the veal calves, Höjberg et al. (2003) and Franklin et al. (2002) also measured greater concentrations of L-lactate in the small intestine than in the rest of the gut or caecum in the pigs. SCFA have previously been studied in the rumen (Quigley et al., 1992) and faeces (Shimomura et Sato, 2006) of dairy calves. The higher levels of total microflora in these digestive compartments mean that the total SCFA concentrations reported, i.e. 127 mM (rumen) and 115 mM (faeces), were much higher than those measured in our study. As was observed in veal calves, acetate is the dominant SCFA in human (Cummings et Macfarlane, 1997) and pig (Gancarcikova et al., 2008) small intestine. The ammonia concentration measured results from an equilibrium between ammonia production (waste from bacterial protein metabolism) and consumption (synthesis of bacterial proteins and intestinal absorption). When digesta flow becomes low, it can be supposed that bacteria utilize endogenous sources of nitrogen such as dead cells or mucus to compensate for the lack of dietary proteins. No studies to date have focused on ammonia in the small intestine of veal calves, but the concentrations found here are lower than those observed in the

small intestine of pigs. Kluge et al. (2006) and Biagi et al. (2006) measured about 30 mM of ammonia in the jejuno-ileum of 8 to 10-week-old weaned piglets.

Lower pH and greater concentrations of L-lactate and total SCFA observed here at 6 h fasting compared to longer fasting durations (Table 2, Figure 1), is highly related to a higher microflora concentration (Figure 6). Indeed, L-lactate and SCFA result from carbohydrate bacterial fermentation and the higher fermentative activity of the microflora leads to acidification of the ecosystem.

In this study, we assessed the main cultured bacterial groups chosen as typical of the total microflora of this ecosystem. Total anaerobic microflora gives a general overview of the ecosystem, and lactate-utilizing bacteria, *Bacteroides fragilis* group, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* and *Enterococci* are taxonomic groups. Enumerating these groups gives an overview of the equilibrium between main cultivable genera. Moreover, we opted to enumerate *E. coli* and *Cl. perfringens* as the proliferation of some strains of these species is the main cause of the major gastro-intestinal diseases in veal calves, i.e. enteritis and enterotoxaemia.

Globally, the microflora concentrations significantly decreased when fasting time increased (Figure 6). The 6h fasting group did not show any particularity whereas the 24 and 12h fasting groups particularly address some remarks. Indeed, the 24h fasting group contained one calf (V101) whose intestinal content did not harbor the main genera group enumerated. It can be supposed that this calf may have had health problems that were not known at slaughter and that were not linked to a significant increase in *E. coli* and *Cl. perfringens* concentrations. Moreover, in the 12h fasting group, total anaerobic microflora



was in the same range for all the animals of this group whereas many selected genera were not found. It is likely that not enumerated microorganisms were present in high concentrations. Thus, this shows strong between-calf variability in the microorganisms composing the intestinal microflora of veal calves in this fasting group.

The effect of fasting time observed on microflora concentrations could be explained by changes in the characteristics of the jejunoileal content in the course of digestion. At 6 h postprandium, intestinal flow is still high and the chyme is continuously renewed, providing a continuous nutrient supply to the intestinal microflora. Furthermore, the bacteria are not in competition for feed and can thus grow at their maximum growth rate. In contrast, 12 h after the meal, chyme flow weakens and becomes irregular. Bacteria enter into competition for nutrients, which impacts on the microflora balance. Other microbial groups, that were not enumerated, could profit from this situation to develop at the expense of the other genera. After a 24 h fast, chyme flow is almost non-existent, and the little remaining jejunoileal content is agglutinated to the intestinal wall. There may be an equilibrium between the death and multiplication of the bacteria derived from the attached microflora, possibly involving a low but stable concentration of microflora.

In published studies on the intestinal microflora of calves, either the analyses were performed on cannulated calves (Hartman et al., 1966) or, when the animals were slaughtered, fasting time before death was never specified (Vlkova et al., 2006). We assume that the contents were sampled when the intestinal flow was high enough to yield a substantial volume. In our study, the jejunoileal content was present in much greater quantities at 6 h postprandium than at 12 or 24 h postprandium. Guilloteau et al. (1986)

measured a maximum flow rate for the chyme at the terminal ileum between 6 and 8 h after the meal. This would mean that our results at 6 h fasting could be related with those obtained by other authors. However, the available literature data cannot be directly linked to the data reported in this study, because age of the calves, digestive compartments and microbial groups studied are never exactly the same as here (Table 6). Vlkova et al. (2006) studied the microflora in the jejunum and caecum of 20-week-old veal calves. They measured 6.3 and 8.9 Log<sub>10</sub>(CFU/mL) of total anaerobes in the jejunum and caecum, respectively. These recent data can be related with those of Schulze et Gunther (1978), who found a progressive increase in total anaerobes, rising from 7.6 in the jejunum to 8.3 in the ileum and 9.3 logs in the caecum of 4 to 17-day-old calves. The concentration of total anaerobes found at 6 h postprandial in the present study (8.2 logs) is consistent with these figures. Lactate-utilizing bacteria have not been described in pre-ruminant calves. Olumeyan et al. (1986) measured 10.1 Log<sub>10</sub>(CFU/mL) of lactate-utilizing bacteria in the rumen of Holstein steers fed a hay and grain diet. This figure is much higher compared to the 7.8 log lactate-utilizing bacteria reported here, probably reflecting the fact that the rumen contains higher levels of total microflora than the small intestine. Moreover, the difference can also be due to other factors, as diet (hay and grain vs milk replacer and grain in our study) and age of the animals. The *Bacteroides fragilis* group, which are considered as the main cultured bacterial group present in the human intestine (Backhed et al., 2005 ; Clavel et al., 2006), were not the predominant group in veal calves (reaching only 6.7 Log<sub>10</sub>(CFU/mL) at 6 h fasting). The concentrations measured here are consistent with those found by Schulze et Gunther (1978) in the distal jejunum (5.2 logs)

and the ileum (7.1 logs) of 4 to 17-day-old calves. We found no difference between *Lactobacilli* and *Enterococci* concentrations, at 7.0 and 6.8 Log<sub>10</sub>(CFU/mL), respectively. *Bifidobacteria*, at 7.7 logs, was predominant (P < 0.05). Vlkova et al. (2006) observed a predominance of *Lactobacilli* with 6.3 and 7.8 logs in the jejunum and caecum, respectively. This is consistent with the concentration found here, but the levels of *Enterococci* (3.4 to 5.8 logs) and *Bifidobacteria* (5.1 to 6.4 logs) measured from the jejunum to the caecum were lower than the levels measured in our 6 h fasting group. Studying 8-day-old calves, Ward (1981) reported 4.6 Log<sub>10</sub>(CFU/mL) of *E. coli* in the whole intestinal chyme. Hartman et al. (1966) suggested that the concentration of coliforms is higher in adult than in young animals, which could explain the difference between our result (6.3 logs) and that of Ward. Studying 8 to 20-week-old calves, Manteca et al. (2001) found a mean *Cl. perfringens* concentration of 4.0-5.0 Log<sub>10</sub>(CFU/mL) in the small intestine of healthy animals vs. 7.0-7.5 logs in diarrheic animals. The pathogen levels they reported in healthy animals were slightly higher than found here (3.4 logs). Daube et al. (1996) reported much greater concentrations of *Cl. perfringens* microorganisms in the small intestine of 8 to 20-week-old healthy calves (7.0 logs). De Rycke et al. (1986) found *Cl. perfringens* in the faeces of calves aged less than 3 weeks old, reporting high inter-individual variability with concentrations ranging from 0 to 9 Log<sub>10</sub>(CFU/g of faeces). These results corroborate our findings, which showed high inter-individual variability in *Cl. perfringens* levels in all the fasted groups.

As the results obtained for the 6 h-fasted group showed much less variability than for the 12 and 24 h-fasted groups and the intestinal content was easier to collect (higher

quantity and fluidity of the chyme), we only characterized the biochemical composition of the chyme in the 6 h-fasted animals. The low concentration of fiber observed in the veal intestinal content is due to the low amount of pellets provided to the animal compared to the milk replacer intake. Lactose constituted almost half of dietary dry matter (data not shown). Yet, its high digestibility means that only very low concentrations reach the calf jejunum-ileum (Mathieu et Barre, 1964). Indeed, lactose is hydrolyzed into galactose and glucose, which are quickly absorbed by the intestinal wall (Thivend, 1976), thus explaining why the concentrations of their free-form galactose and glucose are so low. After acidic hydrolysis, glucose and galactose are present in high concentrations in the digestive samples. It is assumed that these monosaccharides are derived from mucin, which is the main endogenous glycoprotein, where they are bonded to endogenous proteins (Montagne et al., 2000). The AA profile observed was similar to the profile of the animal diet (data not shown), where AAs are constituents of the proteins. The AA profile found in the jejunum-ileum of calves results from complex processes, including but not limited to hydrolysis of dietary proteins, intestinal absorption of AA, di- or tri-peptides, and bacterial protein synthesis. The most important fatty acids measured in the intestinal content are also the main ones present in the veal calf diet (data not shown). As for AA, this fatty acid profile results from several phenomena, including hydrolysis of dietary lipids and absorption in the duodenum and the first part of the jejunum (Mylrea, 1966). In term of minerals, calcium is present in the same order of magnitude in the diet and in the intestinal content, whereas magnesium, phosphorus and potassium are present in half their percentage in the feed and sodium in twice its

percentage in the diet (data not shown). This may be due to between-mineral differences in rates of absorption and secretion through the gastro-intestinal tract (Chandler et Cragle, 1962 ; Smith, 1962 and Yang et Thomas, 1965).

This study provides important information on the biochemical composition and the main cultured microbial groups found in the jejunoileal ecosystem of the veal calves. The database produced here is the first step towards the development of an in vitro system for modeling this environment. Indeed, the biochemical analyses of the intestinal chyme will help in the set up of the nutritive medium provided to the bacteria in the in vitro model and the knowledge of the microflora will allow the validation of the system by comparing its in vitro and in vivo levels. This model should make it possible to pre-screen feed additives as an alternative to the antibiotics previously used as growth promoters in veal calf production, essentially by studying their effect on the modeled microflora.

## PRINCIPALES CONCLUSIONS

Les principales conclusions de ces travaux sont :

- ✚ Le contenu jéjuno-iléal des veaux de boucherie est présent en quantité inversement proportionnelle au temps de jeûne et devient difficile à prélever à des temps de jeûne élevés.
- ✚ La microflore est fortement influencée par le temps de jeûne.
  - En termes qualitatifs, certains groupes bactériens n'ont pas été retrouvés dans le contenu de veaux ayant jeûné entre 12 et 24 heures alors que tous les groupes bactériens recherchés ont pu être quantifiés dans le groupe avec 6 heures de jeûne.
  - En termes quantitatifs, les concentrations des différents groupes bactériens étaient significativement supérieures à 6 heures de jeûne, et significativement inférieures à 24 heures. La variabilité inter-individuelle des résultats était proportionnelle au temps de jeûne, excepté pour *Cl. perfringens*, très variable dans tous les groupes.
- ✚ Le pH est le seul paramètre abiotique significativement influencé par le temps de jeûne des animaux, avec des valeurs plus faibles pour un temps de jeûne plus court.
- ✚ Les concentrations en L-lactate et en acides gras volatiles sont significativement modifiées par le temps de jeûne, avec des concentrations plus élevées à 6 heures de jeûne.
- ✚ Les concentrations en macro-nutriments et les profils en acides gras et acides aminés n'ont été déterminés qu'à 6 heures de jeûne.

Cette première étude a permis de déterminer certaines caractéristiques du contenu jéjuno-iléal du veau de boucherie. En particulier, à 6 heures de jeûne, la microflore étudiée est présente en plus grande quantité et avec une plus faible variabilité qu'à 12 et 24 heures de jeûne. Cette concentration en microflore plus élevée est liée à un pH plus faible et à une concentration en métabolites fermentaires plus élevée, témoins de l'activité métabolique de l'écosystème. Cette étude a donc permis l'obtention d'une base de données pour la mise au point d'un système *in vitro* modélisant l'écosystème intestinal du veau de boucherie. Le temps de jeûne de 6 heures sera conservé comme paramètre constant pour la suite des expérimentations. Les analyses biochimiques du contenu intestinal pour ce temps de jeûne serviront à la mise au point du milieu nutritif utilisé dans le système *in vitro*.

## COMMUNICATION

Ces travaux ont donné lieu à :

❖ Une publication internationale

**Journal of Animal Science, 2009,**

**M. Gérard-Champod**, S. Blanquet-Diot, L. Mazuranok , M. Alric.

Enumeration of some cultivable bacterial groups and characterization of some abiotic parameters in the jejunoileal content of Prim'Holstein veal calves.

(Article 1)

❖ Une communication orale

**4ème Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois**, Mars 2007, Clermont-Ferrand, France.

**M. Champod**, S. Blanquet-Diot, S. Denis, M. Alric.

Mise en place d'un système *in vitro* modélisant l'environnement jéjuno-iléal du veau de boucherie – Développement de nouveaux additifs alimentaires comme alternative aux antibiotiques facteurs de croissance.

(Annexe I)

❖ Deux communications affichées

**Journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**, Avril 2007, Clermont-Ferrand, France.

**M. Champod**, S. Blanquet-Diot, S. Denis, M. Alric.

Caractérisation de la microflore jéjuno-iléale du veau de boucherie et effet du temps de jeûne.

(Annexe II)



**15<sup>èmes</sup> Rencontres Recherche Ruminants**, Décembre 2008, Paris, France.

**M. Champod**, J.-M. Cardot, S. Blanquet-Diot, D. Bravo, M. Alric.

Caractérisation de la microflore intestinale du veau de boucherie et développement d'un système continu *in vitro* simulant cet écosystème.

(Annexe III)

## CHAPITRE II

DEVELOPPEMENT D'UN SYSTEME DE FERMENTATION *IN VITRO*

MODELISANT L'ECOSYSTEME JEJUNO-ILEAL

DU VEAU DE BOUCHERIE :

COMPARAISON AVEC LES DONNEES *IN VIVO*

## CHAPITRE II :

### DEVELOPPEMENT D'UN SYSTEME DE FERMENTATION *IN VITRO*

### MODELISANT L'ECOSYSTEME JEJUNO-ILEAL DU VEAU DE BOUCHERIE :

### COMPARAISON AVEC LES DONNEES *IN VIVO* (ARTICLE 2)

---

#### CONTEXTE ET OBJECTIFS

La première partie de ces travaux de thèse nous a permis de caractériser les principaux groupes bactériens cultivables présents dans le contenu jéjuno-iléal des veaux de boucherie, ainsi que les paramètres majeurs de la composition biochimique du contenu. Grâce à ces données, la mise au point d'un système de fermentation *in vitro*, modélisant l'écosystème jéjuno-iléal du veau a pu être réalisée : elle fait l'objet de ce deuxième chapitre expérimental. L'objectif de la modélisation était de stabiliser *in vitro* les groupes bactériens identifiés lors de la caractérisation microbiologique du contenu jéjuno-iléal, et de contrôler que l'activité métabolique de cette microflore était bien conservée au cours du temps.

Un système *in vitro* continu uni-compartmental a été choisi afin de pouvoir cribler plusieurs additifs alimentaires. Ce système, ayant un volume de travail de 1,2 L, a été inoculé avec un pool de contenus jéjuno-iléaux de trois veaux abattus après 6 heures de jeûne, afin de minimiser la variabilité inter-individuelle. Le fermenteur a fonctionné pendant 7 jours, à un pH 6,5, correspondant au pH moyen mesuré *in vivo*, et à une température de 38,5°C, température corporelle du veau (Ruckebusch, 1977b). Le milieu nutritif était apporté au fermenteur, en continu, au taux de 15 mL/h.

Trois milieux nutritifs différents (M1, M2 et M3) ont été testés dans le système, chacun trois fois, afin d'optimiser le modèle. Le milieu M1 correspondait au milieu développé par Macfarlane (1998) pour la modélisation du colôn humain. En effet, les

principaux groupes bactériens cultivables dans le compartiment jéjuno-iléal du veau de boucherie sont similaires à ceux du colôn humain. Aussi, ce milieu, largement validé chez l'homme, nous a servi de point de départ. Les milieux M2 et M3 ont été développés à partir des données obtenues lors de la première partie de ces travaux expérimentaux sur la composition biochimique du contenu jéjuno-iléal. Ainsi, comparativement à M1, M2 et M3 contenaient des sucres simples, plus de mucine et une source plus complexe de lipides. La différence entre M2 et M3 résidait dans la teneur en fibres, beaucoup plus élevée pour M2. Les trois milieux nutritifs ont été analysés biochimiquement, avec les mêmes méthodes que celles utilisées lors de l'analyse du contenu jéjuno-iléal des veaux.

Afin de pouvoir différencier les 3 milieux nutritifs testés et de déterminer le plus intéressant dans l'objectif de stabiliser la microflore dans le système *in vitro*, une analyse statistique stringente des résultats obtenus lors des différentes fermentations a été réalisée. Puis, les résultats obtenus avec les trois milieux nutritifs ont été comparés aux résultats obtenus *in vivo* dans la première partie expérimentale de ce doctorat.

## **MÉTHODES ET RÉSULTATS**

### **Article 2**

#### **Development of a continuous in vitro system modeling the jejunoileal ecosystem of the veal calf and comparison with in vivo data**

Running title: **In vitro model of the veal calf intestine**

Marie Gérard-Champod<sup>1,2</sup>, Jean-Michel Cardot<sup>1</sup>, Stéphanie Blanquet-Diot<sup>1</sup>, David Bravo<sup>2</sup>,  
Monique Alric<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Equipe de Recherche Technologique « Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament », Faculté de Pharmacie, Université Clermont-Ferrand I, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, Institut Fédératif de Recherche Santé 79, 28 place Henri Dunant, 63 001 Clermont-Ferrand, France.

<sup>2</sup> PANCOSMA SA, Voie-des-Traz 6, C.P. 143, CH-1218 Le Grand-Saconnex, Switzerland.

\* Corresponding author: [Monique.Alric@u-clermont1.fr](mailto:Monique.Alric@u-clermont1.fr),

Phone number: +33 (0) 4 73 17 79 52, fax number: +33 (0) 4 73 17 83 92.

## ABSTRACT

Further to the January 2006 European ban on antibiotics used as growth promoters in the veal calf industry, new feed additives are needed in order to maintain animal health and growth performances. As an alternative to in vivo experiments for screening these additives, an in vitro system modeling the jejunoileal ecosystem of the veal calf was developed. Stabilization of the main cultured microbial groups and their metabolic activity was tracked in an in vitro continuous fermentor operated under anaerobiosis, at pH 6.5 and temperature 38.5°C, and supplied with 3 different nutritive media (M1, M2 and M3). These media mainly differed in their concentrations of simple and complex carbohydrates and in their lipid source. In vitro microbial levels and metabolite concentrations were compared to in vivo data and the biochemical composition of the nutritive media was compared to that of the jejunoileal content. All 3 nutritive media were able to stabilize total anaerobic and aerobic microflora, lactate-utilizing bacteria, *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, *Enterococci* and the *Bacteroides fragilis* group, at levels close to in vivo ones. The microflora was metabolically active, with high concentrations of lactate, ammonia and short chain fatty acids found in the fermentor. Stringent statistical analyses showed that M1 and M3 allowed a better stabilization of the selected microbial groups compared to M2, with inter-trial variability equal to or lower than in vivo inter-trial variability. This in vitro system will soon be useful in the prescreening of new feed additives by studying their effect on intestinal microflora and fermentative metabolites production.

Key words: veal calves, continuous in vitro system, nutritive medium, intestinal microflora, fermentative metabolites, in vivo/in vitro correlation.

## INTRODUCTION

European regulations introduced in January 2006 banned the use of antibiotics as growth promoters (AGPs) at subtherapeutic levels in animal feed (Regulation EC 1831/2003), particularly for veal calves. AGPs generated significantly-enhanced growth performance via complex processes. They induced hormonal changes increasing weight gain, enhanced intestinal immunity and increased digestive enzyme activity, leading to a higher bioavailability of carbohydrates and proteins for the animal (Corpet, 2000). However, without changing microflora composition, AGPs also inhibited bacterial catabolism of carbohydrates, urea and amino acids (Dibner et Richards, 2005). AGP treatment thus provided the animal with higher nutrient availability and led to a decrease in the toxic metabolites produced by bacteria, limiting the energy needed by the animal to detoxify the organism. Consequently, animal growth rates increased.

Although AGPs were initially used to enhance animal growth performance, their actions on intestinal microflora appeared to minimize the incidence of intestinal diseases (Kyriakis et al., 1995). The January 2006 ban is expected to have impacted on veal calf health by leading to more frequent digestive disorders, as previously observed in pigs (Callesen, 2002 ; Verner Wheelogk et Foster, 2002) and poultry (Tornee, 2002) in Denmark, where AGPs have been totally prohibited since 1998. Even though no scientific study has yet been done on calves, there have already been reports of higher death rates (1% increase in mortality rate) in experimental commercial farms subsequent to the withdrawal of antibiotics as growth promoters. The most frequent digestive diseases in



veal calves are enteritis and enterotoxæmia, which are mainly triggered by pathogenic strains of *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Clostridium perfringens* (*Cl. perfringens*) (Lebrun et al., 2007 ; Lee et al., 2007).

Veal calf producers are looking for alternative feed additives to allay the consequences of the AGP ban. Timmerman et al. (2005) studied the effects of a mixture of probiotic bacteria of human origin (*Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Enterococcus* strains) and a calf-specific probiotic containing 6 *Lactobacillus* species isolated from calf faeces on the health status and growth performances of young veal calves. The calves provided with both probiotics showed a lower mortality rate and better weight gain and required less therapy than control calves. Muscato et al. (2002) and Quigley et al. (2002) have shown that prebiotics (ruminal fluid or spray-dried animal plasma) increased weight gain and decreased mortality rates and diarrhea incidence in calves. Donovan et al. (2002) confirmed these effects with a mix of fructooligosaccharides, allicin and probiotics (Enteroguard).

As the onset of intestinal diseases is frequently related to intestinal ecosystem imbalances, it is important to assess the action of feed additives on veal calf intestinal microflora. In vivo studies are expensive and difficult to set up and require large animal populations to be relevant (high inter-individual variability). Alternatively, experiments can be conducted via in vitro systems modeling the gastrointestinal ecosystem of calves, provided the model has been checked as pertinent. This approach should allow an economical and ethical way to screen feed additives by studying their effect on intestinal microflora implanted in the in vitro system, as has already been done for humans (Cleusix et al.,

2008) and swine (Piva et Grilli, 2007). A key development input to an in vitro system for the veal calf is knowledge of its intestinal ecosystem. Thus, we previously characterized the bacterial and biochemical composition of veal calf jejunoileal chyme (Gérard-Champod et al., sous presse). The jejunoileal compartment was studied as it is the main start-site for enterotoxæmia (Manteca et al., 2002). The aim of the present study was to set up an in vitro system where the main cultured microbial groups identified in veal calf jejunoileal chyme are reproducibly stabilized and metabolically active. Different fermentations were conducted to study how the nature of the nutritive medium provided to the system effects the microbial communities and fermentative metabolites. Comparisons were made between in vitro and in vivo levels of these parameters.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Twenty-seven calves of Prim'Holstein breed (age =  $22.3 \pm 1.5$  weeks, mean weight =  $122 \pm 10$  kg) were obtained from 4 different veal farmers running controlled rearing conditions. The calves were fed a standard diet composed of i) a calf milk replacer provided to the animals throughout the fattening period (21 weeks) at a rate ranging from 400 g to 3.5 kg of DM/day from the beginning to the end of fattening; and ii) pellets composed mainly of corn, provided to the calves at a rate ranging from 30 to 250 g per day from the third week of fattening to the end of fattening. They received no antibiotherapy for at least the last 4 weeks running up to the experiments.. The animal housing, husbandry and slaughtering conditions were European Union standards-compliant. Animals were slaughtered by groups of three individuals at 6 h after their last meal, and the gastrointestinal contents were subsequently collected. The meat from the carcasses of the studied animals was fit for human consumption.

**Preparation of the inoculi for in vitro fermentations.** Jejunoileal samples were taken from the intestines of 3 animals within 5 min after slaughter. The whole intestinal content, from the last third of the jejunum to a few centimeters before the end of the ileum was collected and homogenized. The 3 contents were immediately brought to the lab in CO<sub>2</sub>-filled bottles and treated in an anaerobic chamber. Conditions inside the chamber were maintained using commercial premixed gas containing 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 5% H<sub>2</sub> (AirProducts, Paris, France). Anaerobiosis was constantly monitored on an oxygen analyzer (COY laboratory products) and O<sub>2</sub> levels were maintained at 10 ppm or

less using palladium catalysts. The contents were filtered through a gauze to remove the largest particles such as hair. A homogenized pool of the 3 samples (400 mL each) was used as inoculum for the in vitro system. A 5 mL inoculum sample was taken to perform microbial counts at the initial time of fermentation (day 0), and 17 mL were frozen (-20°C) for further metabolite analyses.

**In vitro fermentation conditions.** The experiments were carried out in a continuous culture system (Fig. 1, Bioflo 3000, New Brunswick, Paris, France). The system comprised one glass vessel with an operating volume kept at a constant 1200 mL by a level probe controlling the outflow of fermentative content. A sterile nutritive medium made fresh daily was introduced continuously at a rate of 15 mL/h. Three different nutritive media were tested (see Table 1 for compositions): M1, adapted from Macfarlane et al. (1998), M2 and M3, modified from M1 on the basis of the biochemical composition of veal calf jejunoileal content (Gérard-Champod et al., sous presse). The fermentative medium was permanently stirred by a screw at a rate of 255 rpm, pH was kept at a constant 6.5 units by adding NaOH 3M, and temperature was maintained at 38.5°C. The atmosphere was filtered (0.2 µm) continuously.

During the preparation of the inoculum, the in vitro system was flushed with N<sub>2</sub> to create an anaerobic atmosphere. The inoculum was transferred from the anaerobic chamber to the fermentor in a hermetically-sealed bottle, and fermentation started immediately. N<sub>2</sub> flushing was stopped and the anaerobic conditions inside the vessel were maintained by microbial activity. The anaerobic state of the vessel was controlled daily by measuring O<sub>2</sub> levels via gas chromatography (HP 6890 Series columns: Molecular Sieve 5A and Porapak

Q, Agilent Technologies, Santa Clara, United States). Every day, 22 mL of fermentative medium were collected. Five mL were used for microbial counts and 17 mL were frozen (-20°C) for further metabolite analyses. Samples were taken without opening the system, via a syringe placed on a tube plunged inside the fermentative content. Each experimental condition, i.e. with each different nutritive medium, was tested 3 times (total = 9 runs), and the experiments lasted from 5 to 7 days.

**Biochemical composition of the nutritive media.** The biochemical composition of the 3 nutritive media was analyzed as previously described (Gérard-Champod et al., sous presse). Briefly, humidity was determined by the Karl Fisher method and used to calculate amount of dry matter. Total nitrogen was measured using the Kjeldahl method (ISO5983) and total protein was calculated by multiplying total nitrogen by the Jones factor (5.41). AA profiles were determined on a Biochrom20 amino acid analyzer (Biochrom, Cambridge, United Kingdom). Lactose, glucose and galactose were determined with enzymatic kits (refs 10176303035 and 10716251035, R-Biopharm, Darmstadt, Germany). Glucose and galactose were measured on both raw and hydrolyzed samples. Fat content was measured after Soxhlet extraction with petroleum ether (Bedo et al., 1976). Ash content was quantified on dried samples (550°C).

**Microbial counts.** Total anaerobic and aerobic microflora, *Bacteroides fragilis* group, lactate-utilizing-bacteria, *Lactobacilli*, *Enterococci*, *Bifidobacteria*, *E. coli*, *Cl. perfringens* and yeasts were enumerated on selective solid culture media (Table 2). Serial 10-fold dilutions were done in anaerobic, aerobic or Trypton-Glucose-Yeast (TGY) dilution media. The anaerobic dilution medium was inoculated under CO<sub>2</sub> flow whereas

the TGY dilution medium was inoculated in the anaerobic chamber. All the media were inoculated in duplicate at each dilution level. For total anaerobic microflora, *Bacteroides fragilis* group and *Cl. perfringens*, 100 µL of each serial dilution were inoculated in the anaerobic chamber using the spread-plate method. For *Lactobacilli*, the dilutions were maintained under CO<sub>2</sub> flow and 1 mL of each serial dilution was inoculated using the pour-plate method. For lactate-utilizing bacteria, the roll tubes technique (Leedle et Hespell, 1980) was used to inoculate 1 mL from the same dilution tubes as for *Lactobacilli*. For aerobic microflora, *Enterococci*, *Bifidobacteria* and yeasts, 100 µL of the anaerobic dilution medium was inoculated in aerobic conditions via the spread-plate method. Finally, *E. coli* was inoculated under serial aerobic dilutions using the pour-plate method in aerobic conditions. Media, incubation conditions and times are summarized in Table 2. All the media were incubated at 37°C except for yeasts enumeration (30°C). Microflora was enumerated by visual counting taking into account the media-specific discriminations (see “specifications of the colonies” in Table 2).

**Fermentative metabolite analyses.** Thawed samples were brought to 80°C during 15 min in a water bath to stop enzymatic reactions and then centrifuged (9000 g, 20 min, 4°C), and the supernatants were analyzed for L-lactate and ammonia concentrations using enzymatic kits (kit refs. 10139084035 and 11112732035 from R-Biopharm, Darmstadt, Germany). The short chain fatty acid (SCFA) analyses were run via gas chromatography (HP 6890 Series, HP19091N-133 column in polyethylene glycol 30 m x 250 µm x 0.25µm, split ratio = 3:1, 140°C for 7 min followed by 240°C for 4 min, Agilent Technologies, Santa Clara, United States) according to Jouany (1982). Acetic, propionic, isobutyric, butyric,

isovaleric and valeric acids were analyzed on thawed samples that were deproteinized with mercury chloride I and centrifuged (15000 g, 15 min, 7°C). The internal standard used was the 4-methyl-valeric acid.

**Statistical analyses plan. (i) Descriptive analyses.** The main study objective was to obtain experimental conditions allowing stabilization of most of the microbial populations enumerated at levels close to those observed in vivo and with the best between-trial reproducibility. Stable state of a nutritive medium (M), a trial (T) and a microbial population (P) was defined as a succession of at least three time points with a less than 10% movable coefficient of variability (CV) over 3 values and a global range lower than 2 logs. The beginning of each stable state was characterized by the  $T_{IMPT}$  value (initial Time of the steady-state for each nutritive Medium, bacterial Population and Trial).  $T_{IMP}$  (maximum of  $T_{IMPT}$  among the 3 trials) determined the time point from which the microbial population P was considered stable medium M.  $T_{IM}$  (maximum of  $T_{IMP}$  among all microbial populations) determined the time point from which the overall selected populations were considered stable in medium M.

**(ii) Statistical analyses.** ANOVA analyses were carried out using the GLM procedure bundled with the SAS® software (SAS Institute Carry North Carolina, USA) to study the variability of the microbial populations' stabilized-state levels (i) between trials for a nutritive medium and (ii) between nutritive media (M1, M2 or M3) for the 3 trials.

Fermentative metabolite concentrations were compared to their initial values and between the nutritive media using the unpaired Student's t-test. One-way ANOVA was used to test for significant between-group differences. Using the same method, in vitro

microbial levels and fermentative metabolite concentrations were compared to in vivo levels, and the biochemical profiles of the nutritive media were compared against the jejunoileal content of veal calves. A probability level of  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.



## RESULTS

**Biochemical composition of the nutritive media.** The results of the biochemical analyses on the 3 nutritive media (n=1) are given in Figs. 2, 3 and 4. Similar concentrations in protein (30%) and ash (8%) were observed for the 3 nutritive media but M1 contained less fat than M2 and M3 (3.0 vs. 11.4 and 12.5% respectively) (Fig. 2). Lactose, glucose and galactose were found in lower concentrations in M1 (between 0.06 and 0.19% of dry matter) compared to M2 or M3 (between 1.4 and 3.1%). In the 3 media, acidic hydrolysis led to an increase of glucose and galactose percentages (to approx. 25 and 10%, respectively). The amino acid profile was similar for M1, M2 and M3 (Fig. 3) and showed a main peak constituted by two AA: the glutamic acid and glutamine, as our analytical method did not allow their separation. Most of the other AA was present in concentration ranging from 2 to 7 %. Fatty acid profiles were highly different between nutritive media (Fig. 4). M1 was mainly composed of oleic acid (18:1, 69% of total fat). M2 and M3 shared a similar composition, with 4 major fatty acids between 16 and 26%: palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1) and linoleic acid (18:2). Other fatty acids were detected at concentrations lower than 5% in all 3 media.

**In vitro evolution of the selected microbial groups.** The mean concentrations (n=3) of the enumerated microbial groups are presented in Fig. 5. All 3 nutritive media followed the same trends. Total anaerobic microflora and lactate-utilizing bacteria stabilized between 8 and 10 logs, total aerobic microflora stabilized between 7 and 9 logs, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* and *Enterococci* stabilized between 6 and 8 logs, and the

*Bacteroides fragilis* group stabilized between 5 and 7 logs. All these bacterial groups were stabilized around their initial levels (day 0). *E. coli* was stabilized between 4 and 6 logs, which was far from the initial value (7.5 logs). *Cl. perfringens* and yeasts disappeared from the fermentative medium as early as day 2, and these two groups were not statistically analyzed as they were stabilized close to the zero level.

Table 3 presents the number of stabilized trials over the 3 repetitions for each bacterial population, giving the initial time of the steady state ( $T_{IMP}$ ) and the inter-trial CV.  $T_{IMP}$  are also highlighted in Fig. 5. In all three trials, M1 led to the stabilization of total anaerobic microflora and *Lactobacilli* from day 0, and of *Bacteroides fragilis* group from day 5. Lactate-utilizing bacteria, *Bifidobacteria* and *Enterococci* were stabilized in 2 out of 3 trials ( $T_{IM1} = 4, 2$  and 5 days, respectively), and *E. coli* was stabilized only once, from day 4. Total aerobic microflora, which was only enumerated once with M1, was stabilized from the beginning of the experiment.

In all three trials, M2 led to the stabilization of total anaerobic microflora and lactate-utilizing bacteria from day 0. *Lactobacilli*, *Enterococci* and *E. coli* were stabilized in 2 out of 3 trials ( $T_{IM2} = 0, 3$  and 4 days, respectively), and total aerobic microflora, *Bifidobacteria* and the *Bacteroides fragilis* group were stabilized only once, from day 0, 2 and 1, respectively. In addition, M2 led to foam of the fermentative content in 2 out of 3 trials, and consequently these fermentations were stopped after only 5 days. In all three trials, M3 led to the stabilization of total anaerobic and aerobic microflora and lactate-utilizing bacteria ( $T_{IM3} = 0, 3$  and 3 days, respectively). M3 stabilized the other bacterial populations in 2 out of 3 assays, from day 3 for *Bifidobacteria*, day 5 for *E. coli*, and day 4 for all other

bacterial groups. The time needed for all enumerated bacterial populations to reach a steady state ( $T_{IM} = \max(T_{IMP})$ ) was 5 days for M1 and M3 and 4 days for M2. Variance analysis of the bacterial population concentrations over all the trials at day 0 and during the steady states (Table 4) showed that microflora was stabilized at levels close to day 0 values, except for *Bifidobacteria* and *E. coli* which were stabilized at levels more than 1 log lower than their initial values. At day 0, the variability between the inoculi appeared to be low (between 5% and 21%). During the steady states, mean concentrations of total anaerobic microflora, lactate-utilizing bacteria, *Enterococci* and *Bifidobacteria* were only slightly variable (CV ranging from 5% to 22%), whereas concentrations of total aerobic microflora, *Lactobacilli*, *Bacteroides fragilis* group and *E. coli* showed much stronger variation, with CV of over 30%. The analysis of inter-trial CV during the steady states for each nutritive medium and each bacterial population is given in Table 3. Inter-trial variability was lower for the total anaerobic microflora (from 7% to 12% depending on the nutritive medium) than for the other bacterial groups (from 1% to 49%). M1 led to the lowest CV for *Enterococci*, M2 gave the lowest CV for total anaerobic microflora and lactate-utilizing bacteria, while M3 gave the lowest CV for all the other populations. There was no relationship between inter-trial variability measured for the inoculi and the stable states during in vitro fermentations (Fig. 6).

**In vitro evolution of fermentative metabolites.** L-lactate, ammonia and SCFA concentrations were measured every day during the fermentations with M1, M2 and M3 (Fig. 7). L-lactate concentrations decreased from day 0 to day 1 in all the trials, then increased from day 4 to the end of the experiment with M2 and M3 only. With M1, L-

lactate was undetectable after day 1. There was a significant difference in L-lactate concentrations between M1 and the two other nutritive media during the microbial steady state ( $P \leq 0.009$ ). In all three trials, ammonia levels increased from day 0 (global mean:  $0.23 \pm 0.05$  g/L) to day 2, and remained stable thereafter with M1 and M2. During the microbial steady state, there were significantly ( $P \leq 0.016$ ) higher concentrations of ammonia with M3 than M1 or M2. Total SCFA amounts increased strongly in all three trials from day 0 (global mean: 40 mM) to day 2 (266 mM). Then, with M3, total SCFA concentration seemed to stabilize at around 200 mM up to the end of the experiment, whereas with M1 and M2, total SCFA decreased from day 4 to day 7.

Fig. 8 shows that acetate was the dominant SCFA at the beginning of all the experiments (ranging between 60% and 80% of total SCFA). Acetate percentages were dramatically lower at day 1 compared to day 0 ( $P \leq 0.03$ ), and remained at around 40% until the end of the experiment for all three media. Conversely, propionate percentages were significantly higher ( $P \leq 0.03$ ) at day 1 compared to day 0, but then decreased until reaching values close to day 0 levels (from day 5 for M1 and M2, and day 3 for M3). With M3, propionate percentages became significantly lower in the last day of fermentation compared to day 0 ( $P = 0.04$ ). Isobutyrate, isovalerate and valerate percentages followed the same trends as propionate with a significant increase from day 2 with M1 and M2 and from day 1 with M3, before decreasing at the end of the trial. Butyrate percentages increased throughout fermentation, with mean values over all trials increasing from 11% at day 0 to 48% at the end of fermentation. However, butyrate concentrations were highly variable, and only a few points were statistically different from initial values.

**Comparison with in vivo data.** Nitrogen, protein and ash composition was not significantly different ( $P>0.05$ ) between the calf jejunoileal content and the three media (Fig. 2). However, fat, glucose, galactose and lactose concentrations were lower with M1 (but not M2 or M3) compared to in vivo values. Moreover, we highlighted differences between the amino acid and fatty acid profiles of the nutritive media and the profiles recorded in vivo. Threonine percentages were significantly lower in M1 than in the intestinal content (Fig. 3). Histidine and cysteine concentrations measured in all three nutritive media were statistically different from the in vivo concentrations. In contrast with M2 and M3, the fatty acid profile was different with M1 from that of the veal calf jejunoileal content (Fig. 4). Palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0) concentrations were lower in M1 than in vivo, whereas 4 other fatty acids (16:1, 17:1, 18:1 and 20:1) were measured in higher concentrations in M1 than in the calves. The arachidonic fatty acid (20:4) measured in vivo was found in none of the nutritive media.

Fig. 9 and 10 illustrate the comparative analysis between the microbial and metabolite concentrations obtained during stabilized states of in vitro fermentations and the concentrations measured in vivo (Gérard-Champod et al., sous presse). During fermentations with M1 (Fig. 9A), there were no statistical differences between the levels of microbial populations stabilized in the fermentor and the in vivo levels of all the bacterial groups enumerated ( $P>0.13$ ), except for total anaerobic microflora that was stabilized at a significantly higher concentration in vitro than in vivo ( $P<0.001$ ). Moreover, the interquartile ranges and the amplitude between the minimal and maximal levels were comparable in vivo and in vitro for all the bacterial populations, except for *E.*

*coli* which showed a far more extensive distribution in vivo than in vitro. The median was always located on the same side of the mean in vivo and in vitro, showing a similar data distribution. With M2 (Fig. 9B), total anaerobic microflora and lactate-utilizing bacteria were stabilized at significantly higher concentrations in vitro than in vivo ( $P \leq 0.001$ ). Interquartile ranges were much lower in vitro than in vivo, except for *E. coli*, although the difference between minimal and maximal *E. coli* concentrations remained lower in vitro than in vivo. For most of the bacterial groups, the medians were not on the same side of the means in vivo and in vitro, which means that the values were inversely distributed in vitro and in vivo. There were no significant differences between the in vitro stabilized states with M3 (Fig. 9C) and the in vivo data for *Enterococci*, *Bifidobacteria* and lactate-utilizing bacteria. *Lactobacilli* were stabilized at a higher values in the in vitro system compared to in vivo ( $P = 0.01$ ), whereas the in vitro concentrations of the *Bacteroides fragilis* group and *E. coli* were significantly lower than in vivo values ( $P \leq 0.01$ ). Variance analysis on total anaerobic microflora indicated a significant difference between the two groups, but as the means and medians differed by less than 1 log and the interquartile ranges were overlapping, the difference was not considered significant. The range of bacterial concentrations was lower in vitro than in vivo for all the populations studied, except for lactate-utilizing bacteria which showed a slightly broader range. Concerning fermentative metabolites (Fig. 10), the statistical analyses showed a marginal but nonsignificant difference ( $P \geq 0.06$ ) between in vivo and in vitro levels of L-lactate with M2 and M3, due to high CV ( $> 88\%$ ). L-lactate concentrations during the microbial steady states with M1 are null for all the trials, leading to a lower level in vitro than in vivo

( $P=0.02$ ). Ammonia and total SCFA were stabilized at significantly higher concentrations in the in vitro system than in vivo ( $P<0.001$ ) for all the nutritive media. Moreover, the proportions of each SCFA were different ( $P<0.001$ ) between the in vitro stabilized states and in vivo data (data not shown), except for isovalerate ( $P\geq 0.15$ ).

## DISCUSSION

The Europewide ban on antibiotics used as growth promoters, in particular in the veal calves industry, is expected to lead to new feed additives being used to maintain animal growth performances and health status. With the perspective of reducing animal experimentation for ethical and economical reasons, the aim of this study was to develop an in vitro model of the jejunoileal content of veal calves by stabilizing the main cultured bacterial groups present in this ecosystem at level closes to those found in vivo and keeping them metabolically active.

As there is little published data on the jejunoileal chyme of veal calves, its physico-chemical parameters and biochemical composition were previously determined in vivo (Gérard-Champod et al., sous presse). The in vitro system developed in the present study was based on these in vivo data. pH was controlled at 6.5 and temperature was set at 38.5°C (veal calf body temperature, Ruckebusch, 1977b). Further to preliminary studies in the in vitro system, the renewal time was set at 80 h in order to avoid the rapid flushing of some species. The composition of nutritive medium M1 input to the fermentor was adapted from Macfarlane et al. (1998). This M1 medium has been widely used for the setup of in vitro models reproducing the human gut. It allowed the stabilization of the main cultured bacterial groups found in the human côlon, which are similar to those present in the intestinal chyme of the calves (Gérard-Champod et al., sous presse). Nutritive media M2 and M3 were adapted from M1 on the basis of biochemical analyses carried out on the jejunoileal content of veal calves (Gérard-Champod et al., sous presse).



Indeed, the simple lipid source used in M1 (Tween 80) was replaced by a complex one in M2 and M3 in order to better represent the complexity found *in vivo*, and M2 and M3 were completed with simple sugars found in the jejunoileal contents. Compared to M2, M3 medium was devoid of fibers. Analysis of the three nutritive media (Fig. 2, 3 and 4) showed that M2 and M3 have a biochemical composition clearly closer to that found *in vivo* than M1. So, M2 and M3 appear to be the media best-suited to mimic nutrient supplies in the veal calf jejunoileum.

Total aerobic and anaerobic microflora and taxonomic microbial groups enumerated in the *in vitro* system were chosen as marker populations (McBain et Macfarlane, 1997). *E. coli* and *Cl. perfringens* were counted as they are involved in the main digestive diseases affecting calves (Lebrun et al., 2007 ; Lee et al., 2007). Our fermentative conditions stabilized the main enumerated microbial groups at a level close to the initial value (Fig. 5, Table 4). The global state of the *in vitro* system reflects selective pressure due to many factors, such as bacterial concentrations in the inoculum, the composition of the nutritive medium, fermentor renewal rate and competition for nutrients (Allison et al., 1989). The stabilization of total anaerobic and aerobic microflora showed that the fermentor achieved equilibrium between the main cultured groups. Lactate-utilizing bacteria were maintained at a very similar level to total anaerobic microflora, indicating that most of the bacteria in the fermentor were able to metabolize lactate. Moreover, the fact that *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, *Enterococci* and the *Bacteroides fragilis* group were stabilized close to their initial levels demonstrated that the main cultured genera found in the veal calf were preserved in the *in vitro* system.

Nevertheless, *E. coli* was stabilized at lower concentrations than at day 0 (almost 2 logs under the initial value), showing that the species was not able, in our fermentative conditions, to develop at a high enough growth rate (compared to the dilution rate of the system) to be maintained at its initial level. Moreover, both *Cl. perfringens* and yeasts disappeared from the in vitro model from day 1, meaning that they were rapidly cleared from the in vitro system, probably due to their low concentrations in the inoculum compared to the other bacterial groups enumerated ( $10^3$ - $10^5$  vs.  $10^7$ - $10^8$ ). The elimination of *Cl. perfringens* may also be due to its high sensitivity to oxygen. Indeed, oxygen remaining after N<sub>2</sub> flushing of the vessel needed only a few hours to be totally consumed by the microflora, during which time *Cl. perfringens* inhibition may have occurred. These modifications of the ecosystem of course act as limits to our model, but they remain acceptable as the primary objective of the system is to study feed additive effects on the main cultured microbial groups of the veal calf intestine. Nevertheless, a regular input of *Cl. perfringens* and yeasts in the in vitro system could be a solution that would allow them to be maintained at initial concentrations. Another way to avoid flushing certain microbial populations could be to improve our system by fixing the intestinal microflora in gel beads, as already described by Cinquin et al. (2004).

Advanced statistical analyses were performed in order to select one nutritive medium from among the three tested. Only trials leading to a movable CV over 3 time points of below 10% were considered as stable. This percentage is as low as the analytical variability of the culture method (1 log), and was chosen to ensure highly stringent statistical analysis of the results. This method highlighted the most stable trials for each

bacterial population and each nutritive medium. Following the statistical analyses, none of the three media was able to stabilize all the microbial populations in all the trials (Table 3). M1 and M3 were able to stabilize bacterial populations in at least 2 out of 3 trials, except for *E. coli* which was stabilized only once with M1. M2 appeared to be the less efficient medium, as three of the enumerated populations were stabilized only once, three others were stabilized twice, and only two populations were stabilized in all the trials. It was therefore obvious that M1 and M3 outperformed M2. Considering the inter-trial CV calculated during the steady-states, M3 led to the most reproducible results for the majority (5 out of 8) of the bacterial groups enumerated (Table 3). When considering both the best ratio of steady-state and the lowest inter-trial CV, M1 gave the best results for *Lactobacilli*, *Enterococci* and the *Bacteroides fragilis* group while M3 gave the best results for total aerobic microflora, *Bifidobacteria* and *E. coli*. Further analyses were performed to assess the relationship between the variability at initial fermentation and during the steady state, but there was no link between these parameters (Table 4, Fig.6).

The results obtained during the stabilized in vitro states were compared to those obtained previously in the animals (Gérard-Champod et al., sous presse). The three nutritive media did not give the same results in modeling the in vivo data (Fig. 9). Indeed, M1 allowed the stabilization of microbial populations enumerated at the levels closest to in vivo values (except for total anaerobic microflora, surprisingly). M2 was unable to stabilize the total anaerobic microflora and the lactate-utilizing bacteria close to in vivo levels. Moreover, in vitro and in vivo values were inversely distributed. Surprisingly, with M3, the largest populations such as total anaerobic microflora and lactate-utilizing

bacteria were stabilized at a level close to that obtained in vivo, whereas the in vitro concentrations of some bacterial groups (e.g. *Lactobacilli* and *Bacteroides fragilis* group) were statistically different from in vivo values. Moreover, for all the media, the ranges of values observed during the in vitro stable states were equal to or even lower than those found in vivo. This means that modeling led to a decrease in the inter-individual variability observed in vivo.

Another important step in the setup of the in vitro model was to ensure that the microflora stabilized in the fermentor was metabolically active. All the experiments yielded fermentation products such as lactate, ammonia and SCFA (Fig. 7). However, different trends in metabolites concentrations were observed during fermentations. L-lactate disappeared from the in vitro system (between day 1 and day 3), before reappear afterwards only with M2 and M3, with high variability. Lactate is an intermediate of the bacterial metabolism of carbohydrates used in the production of fatty acids (Seeliger et al., 2002). The difference in lactate concentrations between M1 and the two other media may be due to a higher availability of simple sugars (glucose, lactose, galactose) in these two media (Table 1, Figure 2). Consequently, it can be supposed that L-lactate was produced rather than consumed (by lactate-utilizing bacteria) with M2 and M3 and, inversely, consumed rather than produced with M1. Ammonia accumulated during fermentation at significantly higher levels than at day 0. High concentrations of this metabolite could become toxic for microflora (Muller et al., 2006). Nevertheless, the amounts reached in the in vitro system have been shown to be non-toxic for *E. coli* (Muller et al., 2006), *Cl. perfringens* (Liu et Hsieh, 1969) and yeasts (Hess et al., 2006), which were the only

populations that decreased or disappeared from the system during fermentation. The difference observed between ammonia concentrations with M3 vs. M1 or M2 during the microbial steady state could not be related to compositional differences between these media. During in vitro experiments, propionate, isobutyrate, isovalerate and valerate concentrations followed the same trends as total SCFA (Fig. 8). Inversely, the percentages of acetate (which was the dominant SCFA in the inoculi) decreased very quickly whereas butyrate percentages slowly became predominant. Given that butyrate production results from the butyric fermentation of acetate (Pelmont, 1993), it is likely that the butyrate-producing bacteria in our in vitro conditions possessed a highly developed metabolism. Barcenilla et al. (2000) have isolated butyrate-producing bacteria in the human gut and shown that they mainly fall into cluster XIVa and are related to the *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* group. However, since this bacterial group was not enumerated in our study, we cannot check whether the high butyrate production observed was associated with a high growth of this bacterial group. Compared to the two other nutritive media, M3 allowed a stabilization of the total SCFA concentrations from the day 2 of the trial. Several authors (Allison et al., 1989 ; De Boever et al., 2000 ; Miller et Wolin, 1981) have used the stabilization of total SCFA to determine the steady-state of their in vitro systems, implying a great advantage for M3 in this study.

There was no significant difference between in vitro and in vivo data for lactate concentrations (except for M1), due to high variability in both cases (Fig. 10). Inversely, ammonia and total SCFA were significantly higher in vitro than in vivo. This accumulation may be explained by the fact that our model does not reproduce the

absorption of fermentation products as occurred *in vivo* (Thivend et Toullec, 1977). Upcoming system optimizations should include the addition of a dialysis system to ensure the absorption of excess fermentation products, as has already been done in the dynamic *in vitro* system TIM2 from TNO (Blanquet et al., 2003).

This study described the setup of the first *in vitro* system modeling the jejunoileal ecosystem of veal calves. Our *in vitro* conditions led to the stabilization of a metabolically active complex microflora from day 5, at levels close to *in vivo* values. Advanced statistical analyses were performed to choose the best medium from among the three tested. M1 and M3 gave better results than M2. However, these two media have both pros and cons. M1 medium was able to stabilize the selected bacterial populations at the closest levels to *in vivo* values, whereas M3 showed a closer biochemical composition to jejunoileal content than M1 and is the only medium that allowed the stabilization of total SCFA concentration. This model will be used to pre-screen a new feed additive by studying the effects on the intestinal ecosystem of veal calves, particularly effects on levels of the main cultured bacterial groups and on concentrations of the main fermentative metabolites.

## PRINCIPALES CONCLUSIONS

Les principales conclusions de ces travaux sont les suivantes :

- ✚ Les trois milieux nutritifs ont permis la stabilisation de la majorité des groupes bactériens dénombrés, exceptés *Cl. perfringens* et les levures, qui disparaissaient du contenu fermentaire dès les premiers jours.
- ✚ Les conditions de fermentation ont permis à la microflore d'être métaboliquement active, produisant de l'ammoniaque et des AGCC.
- ✚ Les analyses statistiques ont permis de déterminer que :
  - Le milieu M2, présentant une variabilité des concentrations bactériennes inter-réplicats élevée, est le moins intéressant,
  - Les milieux M1 et M3 permettent une meilleure stabilisation des différents groupes bactériens avec une plus faible variabilité inter-réplicats,
  - Le milieu M1 stabilise les populations bactériennes à des niveaux plus proches de ceux mesurés à J0 que le milieu M3,
  - Le milieu M3 permet une stabilisation des AGCC totaux produits dès J2, contrairement au milieu M1.
- ✚ Enfin, l'analyse biochimique des trois milieux nutritifs a permis de déterminer que le milieu M3 est celui dont la composition se rapproche le plus de celle du contenu jéjuno-iléal des veaux de boucherie. C'est donc le milieu qui a été choisi pour les expérimentations suivantes.

Cette étude a permis de mettre au point un système *in vitro* modélisant l'écosystème jéjuno-iléal du veau de boucherie. Les conditions de fermentation utilisées ont conduit à la stabilisation d'une microflore complexe et métaboliquement active, à des concentrations proches de celles mesurées précédemment *in vivo*. Des analyses statistiques ont permis de choisir le milieu nutritif le plus adapté. Les milieux nutritifs M1 et M3 ont donné des résultats plus intéressants que le milieu M2, en termes de stabilisation des populations bactériennes et de variabilité faible des concentrations inter-réplicats. Cependant, M1 et M3 ont tous les deux des avantages et des inconvénients. Le milieu M1 a permis une stabilisation des populations bactériennes à des concentrations plus proches de celles mesurées *in vivo* que M3, alors que le milieu M3 a permis une stabilisation des AGCC totaux meilleure que celle obtenue avec le milieu M1. Cependant, comme la composition biochimique du milieu M3 est nettement plus proche de celle du contenu jéjuno-iléal des veaux que ne l'est celle du milieu M1, c'est le milieu M3 qui a été sélectionné afin de cribler dans le système *in vitro* de nouveaux additifs alimentaires.



COMMUNICATION
---------------

Ces travaux ont donné lieu à :

❖ Un article soumis dans un journal international

**Applied and Environmental Microbiology**

**M. Gérard-Champod**, J.-M. Cardot, D. Bravo, S. Blanquet-Diot, M. Alric.

Development of a continuous *in vitro* system modeling the jejuno-ileal ecosystem of the veal calf and comparison with *in vivo* data

(Article 2)

❖ Deux communications orales

**4<sup>ème</sup> Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois**, Mars 2007, Clermont-Ferrand, France.

**M. Champod**, S. Blanquet-Diot, S. Denis, M. Alric.

Mise en place d'un système *in vitro* modélisant l'environnement jéjuno-iléal du veau de boucherie – Développement de nouveaux additifs alimentaires comme alternative aux antibiotiques facteurs de croissance.

(Annexe I)

**Gut Microbiome INRA-RRI 2008**, Juin 2008, Clermont-Ferrand, France.

**M. Champod**.

Set up of a continuous *in vitro* system modelling the jejuno-ileal ecosystem of veal calves.

(Annexe IV)

❖ Quatre communications affichées

**BioMicroWorld-2007**, Novembre – Décembre 2007, Seville, Espagne.

M. Champod, S. Blanquet-Diot, S. Gonzalez, D. Bravo, M. Alric.

Influence of the nutritive medium on the stabilization, in a continuous *in vitro* system, of selected bacterial groups from the jejunum-ileum of veal calves.

(Annexe V)

**Gut Microbiome INRA-RRI 2008**, Juin 2008, Clermont-Ferrand, France.

M. Champod, J.-M. Cardot, S. Blanquet-Diot, D. Bravo, M. Alric.

Set up of a continuous *in vitro* system modelling the jejunum-ileal ecosystem of veal calves.

(Annexe VI)

**2008 Joint ADSA-ASAS Meeting**, Juillet 2008, Indianapolis, Indiana, Etats-Unis.

M. Champod, S. Blanquet-Diot, D. Bravo, M. Alric.

Validation of a continuous *in vitro* system modeling the jejunum-ileal ecosystem of veal calves.

(Annexe VII)

**15<sup>èmes</sup> Rencontres Recherche Ruminants**, Décembre 2008, Paris, France.

M. Champod, J.-M. Cardot, S. Blanquet-Diot, D. Bravo, M. Alric.

Caractérisation de la microflore intestinale du veau de boucherie et développement d'un système continu *in vitro* simulant cet écosystème.

(Annexe III)

# CHAPITRE III

IMPACT DU CARVACROL

SUR LA MICROFLORE DU VEAU DE BOUCHERIE MODELISEE

DANS UN SYSTEME DE FERMENTATION *IN VITRO*

## CHAPITRE III :

### IMPACT DU CARVACROL SUR LA MICROFLORE DU VEAU DE BOUCHERIE MODELISEE DANS UN SYSTEME DE FERMENTATION *IN VITRO*

---

#### CONTEXTE ET OBJECTIFS

Après mise au point et optimisation d'un système *in vitro* modélisant l'écosystème jéjuno-iléal du veau de boucherie, cette dernière partie expérimentale a pour objectif de réaliser une étude préliminaire visant à déterminer l'impact d'un premier additif alimentaire sur la microflore intestinale implantée dans le fermenteur et sur son activité fermentaire.

Un additif particulier a été choisi : le carvacrol. Cet additif était déjà utilisé chez Pancosma S.A. dans l'un de ses produits largement commercialisé pour les volailles : X-tract™. Ce dernier contient 5 % de carvacrol, 3 % de cinnamaldéhyde (composé odorant naturellement présent dans la cannelle) et 2 % d'oléorésine de capsicum (extrait du piment). Les effets de cet additif chez la volaille, observés *in vivo* par Pancosma SA, se déclinent par une augmentation des sécrétions enzymatiques, une réduction de l'inflammation des muqueuses digestives et un maintien de l'équilibre microbien intestinal, conduisant à une augmentation de la biodisponibilité des nutriments pour l'animal et donc à une amélioration de ses performances de croissance (Figure 1). Au vu des effets observés *in vivo*, il était intéressant pour Pancosma de connaître plus spécifiquement l'action du carvacrol sur la microflore intestinale. De plus, une étude réalisée chez le veau de boucherie, si l'impact du carvacrol sur la microflore était démontré, leur permettrait d'étendre leur portefeuille de clients pour ce produit.

Notons que quelques études *in vivo* avaient déjà démontré une influence positive du carvacrol sur les performances de croissance et sur l'écosystème microbien de certains animaux d'élevage, lorsque le carvacrol est ajouté à l'alimentation de ces animaux (cf Chapitre II – Etat de l'art). En effet, Bampidis et al. (2005) avaient montré que l'origan,

plante dont l'huile essentielle contient majoritairement du carvacrol, permettait d'augmenter l'efficacité de conversion des aliments chez la dinde (au taux de 35 mg de carvacrol par kg d'aliment). De plus, l'ajout d'X-tract™ à l'alimentation des poulets (100 mg/kg d'aliment) avait permis l'augmentation des concentrations en Lactobacilles et la diminution des taux d'*E. coli* et de *Cl. perfringens* dans l'iléon de ces volailles (Jamroz et al., 2005). L'administration d'un mélange de carvacrol, cinnamaldéhyde et oléorésine de capsicum (taux de carvacrol final : 7,5 mg/kg d'aliment) avait également entraîné une augmentation du ratio Lactobacilles/Entérobactéries de 0,9 à 1,6 dans l'iléon de porcelets sevrés (Manzanilla et al., 2004).

Pour toutes ces raisons, c'est donc le carvacrol qui a été sélectionné par les partenaires industriels comme premier additif à tester.

Dans cette étude réalisée *in vitro*, la dose de carvacrol testée est de 15 ppm, i.e. 15 mg/L de milieu fermentaire, dose correspondant à une valeur intermédiaire entre celle testée chez la volaille (35 mg/kg) et celle testée chez le porcelet (7,5 mg/kg).

## **MATERIELS ET METHODES**

### **I- Animaux.**

Neuf veaux de boucherie de race Prim'Holstein (âge moyen =  $22,3 \pm 1,5$  semaines, poids moyen =  $124 \pm 11$  kg) provenant de 3 éleveurs différents sont utilisés. Ils ont été nourris avec la même alimentation standard que lors des précédentes études (Gérard-Champod et al., sous presse) et n'ont reçu aucun traitement antibiotique durant au moins les 4 dernières semaines avant l'expérimentation. Ils sont abattus par groupes de 3 animaux, 6h après leur dernier repas. Chaque groupe a permis de constituer l'inoculum d'un fermenteur avec carvacrol et d'un fermenteur témoin (voir II, III et IV).

### **II- Préparation de l'inoculum pour les fermentations *in vitro*.**

Les échantillons jejuno-iléaux sont prélevés dans les 5 minutes suivant l'abattage (Figure 2), dans les mêmes conditions que lors des précédentes études (Gérard-Champod et al., sous presse). Température, pH et potentiel d'oxydoréduction sont mesurés (EcoScan pH6, Eutech Instruments, Singapore) avant transfert des contenus intestinaux au laboratoire. Les échantillons sont traités sous une hotte anaérobie dont les conditions atmosphériques sont contrôlées par l'ajout d'un mélange gazeux contenant 90 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> et 5 % H<sub>2</sub> (AirProducts, Paris, France). Les contenus intestinaux sont filtrés sur gaze afin de retirer les plus grosses particules comme les poils. Un pool homogène des échantillons de 3 veaux ( $\approx 200$  mL de chaque échantillon) constitue l'inoculum du fermenteur. 9  $\mu$ L de carvacrol pur sont ajoutés à l'inoculum (concentration de 15 ppm). Vingt-deux mL sont prélevés avant ajout de carvacrol : 5 mL afin de réaliser l'énumération microbienne au temps initial de fermentation (J0) et 17 mL (congelés à -20°C) pour des analyses métaboliques ultérieures.

### **III- Paramètres des fermentations *in vitro*.**

Les expériences sont réalisées dans un système de culture continu : le Bioflo (New Brunswick, Figure 1, Article 2). Un milieu nutritif stérile (composition Tableau 1),

fabriqué chaque jour, est apporté au fermenteur en continu (7,5 mL/h). Ce milieu nutritif est le milieu M3 sélectionné lors de la mise au point du système *in vitro* (Article 2). Il contient 15 ppm de carvacrol pur.

Pendant la préparation de l'inoculum, le système *in vitro* est maintenu sous azote afin de créer une atmosphère anaérobie. L'inoculum est transféré de la hotte anaérobie jusqu'au fermenteur dans une bouteille hermétique et la fermentation commence immédiatement. L'apport d'azote est stoppé et les conditions anaérobies dans le réacteur sont maintenues par la seule activité fermentaire des microorganismes. L'anaérobiose est contrôlée tous les jours par mesure de dioxygène (O<sub>2</sub>) par chromatographie en phase gazeuse (HP 6890 Series, colonnes : Molecular Sieve 5A et Porapak Q, Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis). Par la même méthode, les teneurs en méthane (CH<sub>4</sub>), dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et dihydrogène (H<sub>2</sub>) sont mesurées quotidiennement. Chaque jour, 22 mL de milieu fermentaire sont collectés à l'aide de seringues placées à l'extrémité d'un tube plongeant dans le milieu fermentaire. Cinq mL sont directement utilisés pour l'énumération microbienne et 17 mL sont congelés (-20°C) pour les analyses métaboliques ultérieures. L'expérience est répétée 3 fois, avec 3 inoculi différents, sur une durée de 10 jours.

#### **IV- Réalisation de fermentations « témoins »**

Des fermentations témoins, sans carvacrol, sont réalisées en parallèle de chaque essai avec carvacrol, dans un autre fermenteur, le fermenteur Tryton (Pierre Guérin, Figure 3). Il s'agit d'un réacteur continu fonctionnant de la même façon que le Bioflo et programmé avec les mêmes paramètres. Chaque fermentation témoin est réalisée avec le même inoculum que la fermentation avec carvacrol se déroulant en parallèle.

#### **V- Mesure du potentiel d'oxydoréduction du milieu nutritif**

Le potentiel d'oxydo-réduction du milieu nutritif utilisé, avec et sans carvacrol, est mesuré (n=1), à pH 6,5, à l'aide d'un potentiomètre (EcoScan pH6, Eutech Instruments, Singapore).

## VI- Enumération microbienne

Les flores anaérobie totale, aérobie totale, les bactéries utilisatrices de lactate, les *Bacteroides* du groupe *fragilis*, les *Lactobacilli*, les *Enterococci*, les *Bifidobacteria*, *E. coli*, *Cl. perfringens* et les levures sont dénombrés quotidiennement par culture sur milieux gélosés sélectifs (Gérard-Champod et al., sous presse).

## VII- Métabolites fermentaires

Les échantillons sont décongelés afin de mesurer les concentrations en L-lactate et ammoniacque par kit enzymatique (respectivement réf. 10139084035 et 11112732035, R-Biopharm, Darmstadt, Germany). Les AGCC (acétate, propionate, butyrate, isobutyrate, valérate et isovalérate) sont mesurés par chromatographie en phase gazeuse après déprotéinisation des échantillons au chlorure de mercure I (Gérard-Champod et al., sous presse).

## VIII- Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous la forme d'une moyenne  $\pm$  erreur standard sur la moyenne (ESM). Différentes comparaisons sont effectuées grâce à une analyse de variance à un facteur : les concentrations moyennes en microorganismes et en métabolites fermentaires sont comparées i) pour chaque traitement entre le début des essais (J0) et tous les autres temps de fermentation ; ii) pour chaque temps de fermentation, entre les traitements (avec carvacrol dans le Bioflo ou sans carvacrol dans le Tryton) et iii) pour chaque temps de fermentation, avec les résultats obtenus sans carvacrol lors de la mise au point du système *in vitro* Bioflo (Gérard-Champod et al., sous presse).



## **RESULTATS**

Différents problèmes techniques ont perturbé le déroulement des expériences.

La première fermentation témoin (sans carvacrol) réalisée dans le fermenteur Tryton a dû être stoppée au bout du quatrième jour car le contenu fermentaire avait produit une mousse trop abondante, en contact avec la sonde de niveau, entraînant une évacuation importante du contenu liquide. Cette diminution de niveau ayant pu entraîner des modifications de l'écosystème, les résultats de cette expérience n'ont pas été pris en compte par la suite.

La deuxième fermentation effectuée avec carvacrol dans le fermenteur Bioflo a été arrêtée au bout du troisième jour car une évacuation anormale du contenu fermentaire s'est produite, sans mousse apparente, provoquant la vidange complète du réacteur en moins de 2 heures. Ce problème est resté inexpliqué. L'évacuation ayant eu lieu de façon soudaine, elle n'a pas pu entraîner une modification du contenu fermentaire et les résultats obtenus avant ce problème ont été pris en compte pour cette étude.

Ainsi, seules deux répétitions sans carvacrol et trois répétitions avec carvacrol (dont une de 3 jours seulement) ont pu être prises en compte dans l'analyse des résultats.

### **I- Paramètres physiologiques**

Le Tableau 2 présente les valeurs de température, pH et potentiel d'oxydoréduction mesurés dans les contenus jejuno-iléaux des 3 lots de veaux. Les valeurs de température mesurées sont homogènes entre les lots, ainsi que les potentiels d'oxydo-réduction. Le pH des contenus intestinaux est lui, plus variable (de 5,9 à 6,6).

### **II- Microflore**

Les concentrations moyennes des différents groupes microbiens dénombrés, obtenues lors des fermentations avec carvacrol dans le fermenteur Bioflo (n=3) et sans carvacrol dans le fermenteur Tryton (n=2) sont présentés Figure 4.

La flore anaérobie totale est stable dans les deux fermenteurs dès le début des expériences, à un niveau très proche de celui de l'inoculum.

La flore aérobie totale est stable sans carvacrol dès J0. En présence de carvacrol, elle se stabilise à un niveau inférieur à celui de J0 à partir de J5.

La flore utilisatrice de lactate est stable dès le début des fermentations dans les deux fermenteurs.

Au cours des fermentations avec carvacrol, les Bifidobactéries se stabilisent à partir de J3, à un niveau significativement plus faible que celui mesuré à J0 alors que sans carvacrol, les Bifidobactéries se maintiennent à un niveau semblable à celui de l'inoculum.

Les Lactobacilles sont stables dès J0 sans carvacrol alors que leur concentration est significativement plus faible que celle mesurée dans l'inoculum, de J2 à J5, pour le fermenteur avec carvacrol, puis dès J6, les Lactobacilles se stabilisent à un niveau non significativement différent de celui du début des expériences.

Les Entérocoques sont stables dans le fermenteur sans carvacrol à un niveau proche de celui de l'inoculum, exception faite du point à J5 pour lequel la différence de concentration avec J0 est significative. En présence de carvacrol, les bactéries se stabilisent, dès J5, à un niveau semblable à celui mesuré à J0.

La concentration en *Bacteroides* du groupe *fragilis* diminue tout au long des fermentations, avec ou sans carvacrol. Ce groupe bactérien se stabilise donc à un niveau plus faible que celui de J0 (environ -2 logs), à partir de J8 sans carvacrol et de J6 avec carvacrol.

En présence ou non de carvacrol, *Cl. perfringens* se stabilise dès le début des expériences, à un niveau équivalent à celui mesuré à J0.

Enfin, les levures présentent des courbes de croissance identiques quelles que soient les conditions de fermentation, avec ou sans carvacrol, avec une disparition totale à partir de 3 jours.

Pour les groupes microbiens cités ci-dessus, aucune différence significative n'a donc été observée entre les deux traitements (avec ou sans carvacrol).

Par contre, on observe, pour *E. coli*, une différence significative entre le traitement et le contrôle ( $P < 0,05$ ). Dans le fermenteur avec carvacrol, la concentration en *E. coli* diminue au cours des fermentations par rapport à J0 (environ -3 logs) mais de façon non significative. Par contre, dans le fermenteur sans carvacrol, un lessivage de l'espèce est observé, avec des concentrations significativement inférieures à celles mesurées à J0 dès J4, et il y a disparition de la bactérie du milieu fermentaire à partir de J9.

Les populations microbiennes dénombrées, à l'exception d'*E. coli* et des levures, se sont stabilisées dans les deux fermenteurs, le plus souvent à des niveaux proches de l'inoculum. Le carvacrol n'a pas eu d'effet significatif sur la majorité des populations. Néanmoins, comparativement aux fermentations témoins, dans le fermenteur avec carvacrol, la flore aérobie totale et les Bifidobactéries semblent se stabiliser à des niveaux plus faibles, et le « lessivage » d'*E. coli* semble ne pas avoir lieu.

### III- Métabolites fermentaires

L'évolution des concentrations en L-lactate, ammoniacque et AGCC - acétate, propionate, butyrate, isobutyrate, valérate et isovalérate - est présentée sur la Figure 5.

La concentration en L-lactate évolue de la même façon dans les deux fermenteurs. Elle diminue de façon significative ( $P < 0,05$ ) entre J0 (valeurs à J0 comprises entre 3 et 5 g/L) et J2 pour se stabiliser à partir de J3 pour le fermenteur avec carvacrol et à partir de J5 pour le fermenteur sans carvacrol, à des niveaux très faibles (entre 0 et 1 g/L), mais non significativement différents de ceux mesurés à J0, ceci étant dû à une forte variabilité.

Au contraire, dans les deux fermenteurs, la concentration en ammoniacque augmente significativement pendant les 2 premiers jours (de 0,2 à 3,5 g/L en moyenne) et se stabilise à des niveaux significativement supérieurs à ceux mesurés dans l'inoculum.

L'évolution des AGCC au cours des expériences est similaire dans les 2 fermenteurs.

La concentration en acétate, AGCC majoritaire dans l'inoculum, augmente significativement ( $P < 0,02$ ) le premier jour d'expérimentation. Dans le fermenteur sans

carvacrol, elle se stabilise à des niveaux élevés de J1 à J6 puis diminue pour atteindre une concentration équivalente à celle de l'inoculum à partir de J8. Dans le fermenteur avec carvacrol, la concentration en acétate augmente de J0 à J4 et reste, de J4 à J10, significativement supérieure à celle mesurée à J0.

La concentration en propionate augmente rapidement au début des fermentations pour atteindre un niveau significativement supérieur à celui de l'inoculum, dès J1 pour celles avec carvacrol et J2 pour les fermentations contrôles. A partir de ces 2 temps respectifs, la concentration en propionate diminue pour atteindre des valeurs équivalentes à celle de J0 à partir de J8 sans carvacrol, et J7 avec carvacrol.

En présence de carvacrol, la concentration en butyrate augmente régulièrement et de façon significative dès le premier jour de fermentation, pour atteindre le niveau le plus élevé de tous les AGCC mesurés. En absence de carvacrol, les concentrations en butyrate atteignent le même niveau très élevé en fin d'expérience mais après plusieurs paliers successifs.

Des allures de courbes similaires sont observées pour l'isobutyrate, le valérate et l'isovalérate. On note dans le fermenteur avec carvacrol, une augmentation rapide des concentrations, atteignant dès J1 ou J2 des niveaux significativement supérieurs à ceux mesurés à J0. On observe ensuite une diminution lente, permettant le retour à des concentrations proches de l'inoculum pour l'isobutyrate dès J6. Par contre, les concentrations en valérate et isovalérate restent supérieures à celles mesurées à J0 jusqu'à la fin. Dans le fermenteur sans carvacrol, aucune différence significative n'est mesurée entre J0 et les autres temps pour les trois AGCC, mais ceci est dû à une forte variabilité inter-essais.

La Figure 6 présente les concentrations en  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  et  $\text{O}_2$  mesurées dans la phase atmosphérique du réacteur. Aucune différence significative n'est observée entre le fermenteur avec carvacrol et celui sans carvacrol.

Le  $\text{CH}_4$  est détecté à de très faibles concentrations, avec et sans carvacrol.

La concentration en CO<sub>2</sub> augmente de façon significative dans les deux fermenteurs dès le premier jour (en moyenne 37,9 mM à J1 vs 9,3 mM à J0). Cette concentration reste stable et élevée jusqu'à la fin des essais.

La concentration en H<sub>2</sub> augmente régulièrement dans les deux fermenteurs, avec une concentration significativement supérieure à celle de J0 dans le fermenteur sans carvacrol de J8 à J10 et dans le fermenteur avec carvacrol de J4 à J6. Dans ce dernier, une forte variabilité est observée entre les essais.

Enfin, l'O<sub>2</sub> mesuré disparaît de la phase atmosphérique du fermenteur en moins d'un jour. Cependant, une différence significative ( $P=0,03$ ) a été mesurée à J0 entre le fermenteur avec carvacrol et celui sans carvacrol, ce dernier présentant une concentration plus faible en O<sub>2</sub> (3 vs 14 %).

Les concentrations des différents métabolites du contenu fermentaire évoluent différemment : on note une disparition du L-lactate et de l'O<sub>2</sub>, une accumulation de l'ammoniaque, du butyrate, du CO<sub>2</sub> et de l'H<sub>2</sub> et une rapide augmentation suivie d'une diminution plus lente de tous les autres AGCC. La concentration en O<sub>2</sub> dans la phase atmosphérique à J0 est significativement plus faible dans le fermenteur Tryton sans carvacrol que dans le fermenteur Bioflo avec carvacrol. Pour tous les autres métabolites, aucune différence significative n'a été observée entre les deux traitements (avec ou sans carvacrol).

#### **IV- Comparaison des résultats obtenus dans le fermenteur Tryton sans carvacrol et dans le fermenteur Bioflo, avec et sans carvacrol**

Afin de voir si le type de fermenteur utilisé peut influencer les résultats, les données obtenues au cours de cette étude, dans le fermenteur Tryton sans carvacrol et dans le fermenteur Bioflo avec carvacrol sont comparées entre elles et également comparées à celles précédemment obtenues dans le fermenteur Bioflo sans carvacrol.

#### IV-1. Microflore

##### *Effet fermenteur*

La Figure 7 permet la comparaison des résultats obtenus en absence de carvacrol, dans les deux modèles de fermenteurs Tryton et Bioflo (symbole ☆). Peu de différences significatives sont observées entre les deux fermenteurs pour les flores anaérobie et aérobie totales, la flore utilisatrice de lactate, les Bifidobactéries, les Lactobacilles, les *Bacteroides* du groupe *fragilis* et les levures.

Par contre, dans le fermenteur Tryton, les Entérocoques et *Cl. perfringens* ont été stabilisés à des concentrations significativement supérieures à celles observées dans le fermenteur Bioflo. En effet, les Entérocoques sont stables dans le fermenteur Bioflo à un niveau proche de celui mesuré à J0 alors que dans le fermenteur Tryton, la concentration des Entérocoques présente un plateau de J4 à J7 avec des valeurs supérieures à celle de J0. De plus, dans le fermenteur Tryton, il y a eu stabilisation de *Cl. perfringens*, alors que ce dernier disparaissait de façon systématique dans le fermenteur Bioflo.

A l'inverse, on observe une disparition d'*E. coli* dans le fermenteur Tryton alors que cette espèce se stabilisait dans le fermenteur Bioflo à partir de J5 à un niveau inférieur à celui de l'inoculum.

##### *Effet carvacrol inter-inoculi*

La Figure 7 permet également de comparer les concentrations moyennes des différentes populations obtenues dans le fermenteur Bioflo, avec ou sans carvacrol (symbole \*). Aucune différence n'est observée entre le traitement avec carvacrol et le témoin (sans carvacrol) pour les flores anaérobie et aérobie totales, la flore utilisatrice de lactate, les Bifidobactéries, les Lactobacilles, les Entérocoques, les *Bacteroides* du groupe *fragilis*, *E. coli* et les levures. Cependant, comparativement aux résultats obtenus lors des fermentations témoins, les résultats obtenus lors des fermentations avec carvacrol présentent moins de variabilité entre les essais et dans le temps au cours de la fermentation, un fois l'état stable atteint.

L'ajout de carvacrol a par contre eu un effet significatif ( $P < 0.007$  pour J2 et de J4 à J7) sur *Cl. perfringens* en permettant sa stabilisation, à un niveau proche de celui de l'inoculum. Dans le fermenteur Bioflo sans carvacrol, *Cl. perfringens* disparaissait du milieu fermentaire dès le 2<sup>ème</sup> jour.

#### IV-2. Métabolites fermentaires

##### *Effet fermenteur*

La Figure 8 présente la comparaison entre des concentrations en métabolites mesurées dans les deux fermenteurs (Tryton et Bioflo), sans carvacrol.

Le passage du fermenteur Bioflo au fermenteur Tryton a entraîné une diminution de la concentration en L-lactate mesurée après 4 jours de fermentation. Dans le fermenteur Bioflo, des concentrations en L-lactate très élevées ont été retrouvées dans 2 essais sur 3, entraînant une très forte variabilité inter-essais.

Une meilleure stabilisation de l'ammoniaque a été observée dans le fermenteur Tryton comparativement au fermenteur Bioflo dans lequel les concentrations en ammoniaque réaugmentent à partir de J5.

Pour tous les AGCC, excepté le butyrate, une différence significative est observée entre les concentrations mesurées dans les inoculi du fermenteur Bioflo et celles mesurées dans les inoculi du fermenteur Tryton. Des concentrations significativement supérieures en acétate ont été mesurées dans le fermenteur Tryton comparativement à celles mesurées dans le fermenteur Bioflo. Ceci a également été observé pour le propionate à partir de J2. En ce qui concerne la concentration en butyrate, une augmentation constante a été observée dans le fermenteur Bioflo avec des niveaux significativement supérieurs à ceux mesurés dans le fermenteur Tryton de J2 à J3. Dans le fermenteur Tryton, la concentration en butyrate évolue par palliers, pour atteindre les mêmes concentrations que dans le fermenteur Bioflo en fin de fermentation. Enfin, les concentrations en isobutyrate, valérate et isovalérate ne diffèrent pas significativement entre les deux fermenteurs.

La Figure 9 montre les concentrations en gaz mesurées dans le fermenteur Bioflo et le fermenteur Tryton sans carvacrol. Aucune différence significative entre les concentrations en CH<sub>4</sub> et H<sub>2</sub> mesurées n'a été mise en évidence.

L'évolution de la concentration en CO<sub>2</sub> mesurée dans le fermenteur Bioflo est similaire à celle observée dans le fermenteur Tryton. Cependant, à J4 et J5, elle se stabilise à un niveau significativement inférieur dans le fermenteur Tryton à celui mesuré dans le fermenteur Bioflo ( $P < 0,015$ ).

La concentration en O<sub>2</sub> mesurée dans le fermenteur Bioflo est supérieure à celle mesurée dans le fermenteur Tryton à J0 (8,8 vs 3,1 % de la phase atmosphérique,  $P = 0,10$ ). Par la suite, le fermenteur Bioflo présente quelques traces d'O<sub>2</sub> certains jours alors que le fermenteur Tryton est totalement anaérobie.

#### *Effet carvacrol inter-inoculi*

La Figure 8 présente la comparaison des concentrations en métabolites fermentaires obtenus dans le fermenteur Bioflo, avec ou sans carvacrol.

Une diminution de la concentration en L-lactate après 3 jours de fermentation a été observée avec l'ajout de carvacrol.

Une meilleure stabilisation de l'ammoniaque a été observée en présence de carvacrol alors qu'une concentration variable était mesurée dans le fermenteur sans carvacrol à partir de J5.

Des différences significatives ont été observées pour les AGCC. En effet, une production plus importante d'acétate, de propionate, de butyrate et d'isovalérate a été observée en présence de carvacrol, tout en conservant la même évolution au cours des essais. Par contre, les concentrations en isobutyrate et valérate ne sont pas significativement influencées par l'addition de carvacrol.

La comparaison des concentrations en gaz présents dans la phase atmosphérique du Bioflo, avec ou sans carvacrol, est présentée sur la Figure 9. Au vu de l'importante variabilité mesurée au cours des essais pour le CH<sub>4</sub> et l'H<sub>2</sub>, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre le traitement et le témoin.



Par contre, la quantité de CO<sub>2</sub> produite en présence de carvacrol est significativement supérieure à celle produite sans carvacrol ( $P < 0.02$ ) de J4 à J5.

Une différence significative a également été observée en ce qui concerne le taux d'O<sub>2</sub> mesuré à J0 avec ou sans carvacrol (14,6 vs. 8,8 %,  $P = 0,019$ ).

## DISCUSSION

L'objectif de ce travail était d'étudier *in vitro* l'effet du carvacrol, additif alimentaire pouvant potentiellement remplacer les AFCs utilisés chez le veau de boucherie, sur l'écosystème jéuno-iléal de cet animal. Précédemment, cet environnement digestif a été modélisé en utilisant un fermenteur continu nommé Bioflo (Article 2). Compte tenu de la variabilité interindividuelle observée dans les contenus intestinaux des veaux, il a été décidé d'étudier l'effet du carvacrol comparativement à un témoin sans carvacrol, en parallèle sur deux fermenteurs ensemencés avec le même inoculum. Afin de réaliser cette étude, un deuxième fermenteur, le Tryton, ayant un fonctionnement très proche de celui du Bioflo, et permettant le contrôle des mêmes paramètres, a été mis en place.

Comme pour les études précédentes, la flore anaérobie totale, la flore aérobie totale et la flore utilisatrice de lactate ont été dénombrées afin d'obtenir une vision globale de l'écosystème bactérien. Les Lactobacilles, les Bifidobactéries, les Entérocoques et les *Bacteroides* du groupe *fragilis* ont été énumérées en tant que principaux groupes taxonomiques cultivables de l'écosystème intestinal. Les espèces *E. coli* et *Cl. perfringens* ont été étudiées car elles représentent une cause importante de maladies gastro-intestinales chez le veau de boucherie (Kang et al., 2004 ; Manteca et al., 2001). Les levures représentant la part non bactérienne de cet écosystème ont également été dénombrées.

De plus, l'activité métabolique, sur laquelle certains additifs alimentaires peuvent jouer de façon significative (Smiricky-Tjardes et al., 2003), a été mesurée. Le L-lactate, l'ammoniaque, les acides gras à courte chaîne et les gaz sont les principaux produits de la fermentation bactérienne et ont donc été choisis pour suivre cette activité.

Lorsque les concentrations microbiennes obtenues dans le fermenteur Tryton sans carvacrol et le fermenteur Bioflo avec carvacrol ont été comparées (Figure 3), peu de

différences significatives ont été observées (certainement à cause d'une variabilité inter-essais élevée) pour les microflore anaérobies et aérobies totales ainsi que pour les principaux groupes taxonomiques dénombrés. En particulier, les deux fermenteurs ont permis la stabilisation de *Cl. perfringens* au niveau mesuré dans l'inoculum. Cependant, *E. coli* présente une courbe de concentration particulière avec un « lessivage » nettement plus important dans le fermenteur Tryton sans carvacrol que dans le fermenteur Bioflo avec carvacrol. L'effet du carvacrol sur la microflore dénombrée dans cette étude semble donc être limité à une amélioration de la stabilisation d'*E. coli*.

Peu de différences ont également été observées entre les concentrations en métabolites fermentaires mesurées dans le fermenteur avec carvacrol et le fermenteur contrôle (Figure 4). Les allures des courbes sont semblables et les différences de concentrations ne sont pas significatives au vu de la variabilité importante des résultats.

Dans les deux fermenteurs, une accumulation d'ammoniaque et de butyrate est observée. Ceci est vraisemblablement dû à l'absence, dans notre modèle, de système mimant l'absorption intestinale des produits de fermentation se produisant *in vivo*. Les concentrations des autres AGCC mesurés augmentent rapidement durant les deux premiers jours de fermentation puis diminuent. Cette évolution est certainement due à une production importante des AGCC par les microorganismes, qui les réutilisent ensuite comme sources de carbone.

Le carvacrol n'a pas non plus eu d'effet significatif sur la production de gaz dans les réacteurs (Figure 5). Les concentrations en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> mesurées dans la phase atmosphérique illustrent l'activité fermentaire des microorganismes qui consomment l'O<sub>2</sub> restant dans le réacteur au moment du départ des fermentations et produisent du CO<sub>2</sub> et du H<sub>2</sub>. La production de CO<sub>2</sub> est stable dès J1 alors que la production en H<sub>2</sub> augmente tout au long des expériences. En effet, l'H<sub>2</sub> n'est qu'un produit mineur de la fermentation bactérienne comparativement au CO<sub>2</sub> (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007) qui lui, arrive rapidement à saturation dans la phase atmosphérique du système. Le méthane est produit de façon aléatoire dans les deux fermenteurs, production due aux archées méthanogènes, microorganismes hydrogénotrophes. Les veaux utilisés dans cette étude, âgés de 22

semaines, étaient pré-ruminants. Les Archées sont des procaryotes principalement rencontrées dans les parties postérieures du tractus gastro-intestinal (côlon, caecum) où le transit digestif est plus lent et les fermentations plus intenses (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007). Dans l'intestin grêle des veaux, où les conditions ne leur sont pas favorables, leur concentration est donc certainement très faible.

Afin de s'assurer de la reproductibilité de modélisation entre le fermenteur Tryton et le fermenteur Bioflo, les résultats obtenus dans la présente étude ont été comparés (Figure 6, 7 et 8) à ceux obtenus lors de la mise au point du fermenteur Bioflo sans carvacrol (Article 2). Les conditions expérimentales de cette précédente étude étaient exactement les mêmes que celles utilisées dans les fermentations dans le fermenteur Tryton sans carvacrol ou dans le fermenteur Bioflo avec carvacrol (pH, température, agitation, composition du milieu nutritif, taux de renouvellement du système). Seuls les inoculi utilisés étaient issus de veaux différents.

Nos résultats montrent que le fermenteur Tryton conduit à des résultats différents de ceux obtenus avec le fermenteur Bioflo pour certaines populations bactériennes. En effet, il a été observé dans le fermenteur Tryton sans carvacrol (comparativement au fermenteur Bioflo sans carvacrol) une augmentation significative des Entérocoques, un « lessivage » d'*E. coli* et une stabilisation de *Cl. perfringens*. De plus, en ce qui concerne la production de métabolites, une différence significative a été montrée pour les concentrations en acétate et en propionate, bien plus importantes dans le fermenteur Tryton. Ce résultat montre que, parallèlement aux modifications de microflore, l'activité fermentaire de l'écosystème a également été modifiée entre les fermenteurs Bioflo et Tryton.

Le fermenteur Tryton ne permettant donc pas de reproduire exactement ce qui avait été observé dans le fermenteur Bioflo, la comparaison effectuée entre le fermenteur Tryton sans carvacrol et le fermenteur Bioflo avec carvacrol doit être considérée avec beaucoup de précaution. Nous avons donc comparé les résultats obtenus avec carvacrol et sans carvacrol dans un même fermenteur : le Bioflo. Malgré la différence d'inoculi utilisés

dans le cadre de ces deux expériences, aucune différence significative n'est mise en évidence en ce qui concerne les concentrations des différentes populations microbiennes mesurées à J0 (Figure 6). Aussi, la comparaison des résultats obtenus dans le Bioflo, avec ou sans carvacrol est possible, malgré la différence d'inoculi.

Le carvacrol n'influence pas de façon significative la stabilisation des différents groupes microbiens étudiés, sauf celle de *Cl. perfringens*. Le carvacrol semble plutôt améliorer la stabilisation des populations dénombrées avec une variabilité inter-essais inférieure à celle mesurée sans carvacrol. Lors de l'ajout d'additif, *Cl. perfringens* s'est stabilisé à un niveau proche de celui de l'inoculum, état jamais atteint auparavant dans le fermenteur Bioflo sans carvacrol. Ce résultat n'était pas attendu. En effet, Jamroz et al. (2005) ont montré qu'un mélange de capsaïcine, de cinnamaldehyde et de carvacrol (X-tract™) entraînait la diminution de la concentration en *Cl. perfringens* dans le contenu iléal de poulets, et Juneja et al. (2006) avaient montré que l'ajout de carvacrol à 0,1 % dans des steaks hachés inhibait de façon significative la croissance et la sporulation de *Cl. perfringens* dans l'aliment. Le résultat obtenu dans le système *in vitro* de cette étude n'est donc pas cohérent avec les connaissances actuelles et ce modèle ne semble donc pas permettre, dans l'état, l'étude de l'effet du carvacrol sur la microflore intestinale. Notons qu'une augmentation significative des concentrations en acétate, propionate et isovalérate produits dans le réacteur a également été observée lors de l'ajout de carvacrol. Cette augmentation est probablement due à la prolifération de *Cl. perfringens*.

La similarité de résultats (stabilisation de *Cl. perfringens* et augmentation des concentrations de certains AGCC) entre les fermentations avec ajout de carvacrol dans le fermenteur Bioflo et les fermentations sans carvacrol dans le fermenteur Tryton amène à un questionnement. Il a été observé que le taux d'oxygène présent dans le fermenteur Tryton au temps initial de fermentation, était beaucoup plus faible que celui mesuré dans le fermenteur Bioflo (Figure 4). L'espèce *Cl. perfringens* étant anaérobie stricte, une quantité d'O<sub>2</sub> plus faible à J0 dans le fermenteur Tryton a pu favoriser sa reprise dans le milieu fermentaire. Le carvacrol étant une espèce réductrice, cet additif a pu entraîner le

même résultat dans le fermenteur Bioflo, par réduction de l'oxygène. Cependant, un réducteur d'oxygène était déjà apporté au fermenteur dans le milieu nutritif : la cystéine-hydrochlorée. Une comparaison de leurs pouvoirs réducteurs respectifs a été réalisée. Le potentiel rédox a été mesuré dans le milieu nutritif, à pH 6,5, avec et sans carvacrol (n=1), la mesure du potentiel rédox dans le milieu fermentaire n'étant techniquement pas possible. Le milieu nutritif contrôle présente un potentiel rédox égal à -87 mV alors qu'il s'élève à -98 mV avec carvacrol. L'apport du carvacrol entraîne donc une augmentation du pouvoir réducteur du milieu nutritif.

Il semble donc que les conditions anaérobies, pendant les premières heures de fermentation, puissent conditionner l'évolution de l'écosystème au sein du modèle, en particulier le développement d'espèces anaérobies exigeantes et leur métabolisme.

## CONCLUSIONS

Cette dernière partie expérimentale avait pour but d'étudier l'impact sur la microflore intestinale du veau de boucherie, modélisée *in vitro*, d'un additif alimentaire pouvant potentiellement remplacer les AFCs : le carvacrol. Il s'est avéré que les essais dans le fermenteur Bioflo avec carvacrol n'ont pu être comparés aux essais contrôles effectués avec les mêmes inoculi mais dans un fermenteur différent (Tryton). En effet, les essais contrôles effectués dans le Tryton n'ont pas permis de reproduire les résultats obtenus précédemment dans le fermenteur Bioflo sans carvacrol. Cette comparaison a donc été faite dans un même fermenteur (Bioflo) mais avec des inoculi différents. L'ajout de carvacrol a permis la stabilisation de l'espèce pathogène *Cl. perfringens*, jamais stabilisée auparavant lors des essais contrôles sans carvacrol. Cette stabilisation semble due aux propriétés anti-oxydantes du carvacrol. Il est donc difficile de conclure sur l'impact du carvacrol sur la microflore du veau. Pour cela, une optimisation du système *in vitro* est nécessaire. L'ajout d'une molécule au pouvoir antioxydant plus fort que celui du carvacrol permettrait de supprimer l'effet anti-oxydant du carvacrol dans le modèle et de mieux déterminer l'impact réel de cet additif sur la microflore intestinale du veau de boucherie.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

En Janvier 2006, la totalité des antibiotiques utilisés comme facteurs de croissance, à des doses subthérapeutiques, ont été interdits dans l'alimentation animale par l'Union Européenne. Les AFCs permettaient une amélioration des performances de croissance des animaux et une diminution de la fréquence d'apparition des pathologies gastro-intestinales, via la régulation de la microflore intestinale et de son équilibre. Depuis l'interdiction, les producteurs de veau de boucherie sont à la recherche de nouveaux additifs alimentaires leur permettant de retrouver les performances de croissance des animaux et de diminuer la prévalence des pathologies gastro-intestinales. Un très grand nombre d'alternatives aux AFCs s'offrent à l'industrie du veau de boucherie : oligo-éléments, enzymes, acidifiants, prébiotiques, probiotiques, extraits de plante. Le choix au sein d'un si grand nombre de possibilités est complexe et très peu de travaux ont été réalisés à ce jour chez le veau. L'objectif central des travaux de ce doctorat était donc de mettre au point un outil permettant le « screening » de plusieurs additifs alimentaires.

En raison de la très forte interaction entre la microflore intestinale et l'hôte, le choix a été fait de cribler les nouveaux additifs en fonction de leur influence sur l'équilibre de cette microflore. Ainsi, pour des raisons aussi bien éthiques et qu'économiques, l'utilisation d'un système de fermentation *in vitro*, modélisant l'écosystème intestinal du veau de boucherie, s'est imposé. De plus l'objectif étant de tester un très grand nombre d'additifs, le choix d'un système fonctionnant en continu était indispensable.

Comme très peu de données étaient disponibles dans la littérature concernant la nature et l'activité métabolique des différentes populations de l'écosystème jéjuno-iléal du veau de boucherie, le premier objectif de ces travaux a consisté à caractériser *in vivo* les principaux groupes bactériens cultivables présents dans le contenu jéjuno-iléal des veaux de boucherie, et à évaluer un certain nombre de paramètres abiotiques caractérisant cet écosystème.



L'étude, effectuée en fonction du temps de jeûne, a démontré que les principaux groupes bactériens connus pour coloniser le côlon (flore anaérobie totale, flore utilisatrice de lactate, *Bacteroides* du groupe *fragilis*, Lactobacilles, Bifidobactéries, Entérocoques, *E. coli* et *Cl. perfringens*), étaient également présents dans le contenu jéjuno-iléal du veau. De plus, une évolution de la microflore a été observée en fonction du temps de jeûne des animaux, avec une microflore plus abondante et moins variable entre les individus à un temps de jeûne faible (6h) comparativement à celle présente à des temps de jeûne plus longs (12 ou 24h). Cette concentration en microflore, plus élevée à 6h de jeûne, est associée à un pH plus faible et à une concentration en métabolites fermentaires plus élevée, témoins de l'activité métabolique de l'écosystème. Le temps de jeûne de 6 heures a été choisi pour la suite des expérimentations et ce, principalement en raison de la faible variabilité inter-individuelle. Les analyses biochimiques du contenu intestinal réalisées pour ce temps de jeûne ont servi de base de données pour la mise au point du milieu nutritif qui sera utilisé dans le modèle *in vitro*.

Grâce à ces données *in vivo*, la mise au point d'un système de fermentation *in vitro*, modélisant l'écosystème jéjuno-iléal du veau a pu être réalisée. L'objectif était de stabiliser *in vitro* les groupes bactériens identifiés *in vivo* lors de la caractérisation microbiologique du contenu jéjuno-iléal, et de vérifier la conservation dans le temps de l'activité métabolique de cette microflore.

Un système *in vitro* continu uni-compartmental a été choisi afin de pouvoir cribler plusieurs additifs alimentaires. Ce système, ayant un volume de travail de 1,2 L, a été inoculé avec un pool de contenus jéjuno-iléaux de trois veaux abattus après 6 heures de jeûne, afin de minimiser la variabilité inter-individuelle. Le fermenteur a fonctionné pendant 7 jours, à un pH 6,5, correspondant au pH moyen mesuré *in vivo*, et à une température de 38,5°C, température corporelle du veau. Le milieu nutritif était apporté au fermenteur, en continu, au taux de 15 mL/h, correspondant à un temps de rétention de 80 heures.

Trois milieux nutritifs différents (M1, M2 et M3) ont été testés dans le système, chacun trois fois, afin d'optimiser le modèle. Le milieu M1 correspondait au milieu développé par Macfarlane (1998) pour la modélisation du côlon humain. Les milieux M2 et M3 ont été développés à partir des données obtenues lors de la caractérisation de la composition biochimique du contenu jéjuno-iléal. Ainsi, comparativement à M1, M2 et M3 contenaient des sucres simples, plus de mucine et une source plus complexe de lipides. La différence entre M2 et M3 résidait dans la teneur en fibres, beaucoup plus élevée pour M2.

Les trois milieux nutritifs ont permis la stabilisation des groupes bactériens dénombrés, exceptés *Cl. perfringens* et les levures, qui disparaissaient du contenu fermentaire dès les premiers jours. Leurs faibles concentrations dans les inoculi, relativement à celles des autres populations dénombrées, suggèrent que leur disparition est due à une exclusion de compétition. La disparition de *Cl. perfringens* pourrait également être due à son intolérance à l'oxygène, présent à hauteur d'environ 10% dans la phase atmosphérique du réacteur pendant les premières heures de fermentation.

Les conditions de fermentation ont permis à la microflore de conserver son activité métabolique au cours du temps, produisant de l'ammoniaque et des AGCC. Cependant, une accumulation des produits de fermentation a été observée, certainement due à l'absence de simulation des phénomènes d'absorption ayant lieu *in vivo*.

Une analyse statistique stringente des résultats, réalisée dans le but de sélectionner pour le crible ultérieur des additifs l'un des 3 milieux nutritifs testés, a permis d'écarter le milieu M2, donnant des résultats inter-réplicats beaucoup plus variables que les deux autres milieux. Les milieux M1 et M3 ont en effet conduit à une meilleure stabilisation des différents groupes bactériens avec une plus faible variabilité inter-réplicats. Les concentrations bactériennes mesurées dans le système *in vitro* ont été comparées aux données obtenues précédemment *in vivo*. Le milieu M1 a permis une stabilisation des populations bactériennes à des niveaux plus proches de ceux mesurés à J0 que le milieu M3. Cependant, le milieu M3 a permis une stabilisation des concentrations en AGCC, contrairement au milieu M1.

Les trois milieux nutritifs ont de plus été analysés biochimiquement, avec les mêmes méthodes que celles utilisées lors de l'analyse du contenu jéjuno-iléal des veaux. Ceci a permis de déterminer que le milieu M3 est celui dont la composition se rapprochait le plus de celle du contenu jéjuno-iléal des veaux de boucherie, le milieu M1 étant nettement différent.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, il était difficile de conclure entre M1 et M3 sur le milieu nutritif le plus adapté pour tester l'impact de nouveaux additifs alimentaires sur la microflore jéjuno-iléale du veau de boucherie. Cependant, c'est le milieu M3 qui a été choisi, principalement parce que sa composition biochimique était la plus proche de la composition du contenu jéjuno-iléal du veau de boucherie.

Après la mise au point et l'optimisation du système *in vitro* modélisant l'écosystème jéjuno-iléal du veau de boucherie, la dernière partie expérimentale a eu pour objectif de réaliser une étude préliminaire visant à déterminer l'impact d'un additif alimentaire sur la microflore intestinale implantée dans le fermenteur et sur son activité fermentaire.

L'additif choisi pour cet essai - le carvacrol - est un extrait d'huile essentielle d'origan, déjà utilisé chez un des partenaires industriels (Pancosma S.A.) dans l'un de ses produits largement commercialisé pour les volailles : X-tract™. L'objectif de ces essais était de déterminer l'impact ou non du carvacrol sur la microflore intestinale du veau. En effet, le carvacrol avait déjà démontré *in vivo* des aptitudes à influencer l'équilibre microbien intestinal en augmentant le ratio Lactobacilles/Entérobactéries chez les volailles (Jamroz et al., 2005) et les porcelets (Manzanilla et al., 2004).

Les essais ont été réalisés dans deux fermenteurs, en parallèle, inoculés avec le même pool de contenus jéjuno-iléaux de veaux sur 10 jours, et paramétrés de la même façon que lors de la mise au point du système. Un des fermenteurs constituait le témoin (fermenteur Tryton), et l'autre (fermenteur Bioflo) contenait du carvacrol à raison de 15ppm dans le milieu nutritif et dans l'inoculum. Il s'est avéré que les essais dans le fermenteur avec carvacrol n'ont pu être comparés aux essais contrôles effectués avec les mêmes inoculi mais dans un fermenteur différent (Tryton). En effet, les essais contrôles effectués dans le

fermenteur Tryton n'ont pas permis de reproduire les résultats précédemment obtenus dans le fermenteur Bioflo sans carvacrol. L'effet du carvacrol a donc été analysé comparativement aux essais réalisés sans carvacrol dans le fermenteur Bioflo lors de la mise au point du système, mais avec des inoculi différents.

L'ajout de carvacrol n'a pas eu d'influence significative sur la majorité des groupes microbiens dénombrés, excepté sur *Cl. perfringens*. En effet, l'ajout de carvacrol au milieu nutritif a permis de stabiliser cette espèce pathogène, jamais stabilisée auparavant lors des essais contrôles sans carvacrol. Ce résultat inattendu pourrait peut-être s'expliquer par les propriétés anti-oxydantes du carvacrol. Il est donc difficile de conclure sur l'impact ou non du carvacrol sur la microflore du veau car son activité anti-oxydante semble avoir primé sur son activité anti-microbienne. Le modèle utilisé n'est donc pas tout à fait adapté à l'étude de cet additif alimentaire. L'ajout, dans le milieu nutritif, d'une molécule au pouvoir antioxydant plus fort que celui du carvacrol devrait permettre de supprimer l'effet antioxydant de ce dernier et de mieux déterminer l'impact réel de cet additif sur la microflore intestinale du veau de boucherie.

En conclusion, ce travail de doctorat a tout d'abord permis d'augmenter les connaissances relatives à la microflore jéjuno-iléale du veau de boucherie, qui avait été très peu étudiée jusque là. Cependant, ces données sont encore incomplètes et l'utilisation de méthodes moléculaires devrait permettre de mieux caractériser les différentes espèces de cet écosystème complexe.

De plus, un système *in vitro* continu modélisant l'écosystème jéjuno-iléal du veau de boucherie a été mis au point et optimisé de manière à stabiliser la majorité des grands groupes bactériens cultivables. Cependant, une variabilité relativement importante des résultats a été observée, probablement due à un état transitoire du modèle. Une réduction du temps de rétention du système ainsi que la mise en place d'un temps de stabilisation plus long permettraient certainement de se rapprocher des conditions *in vivo* et de réduire la variabilité observée. De plus, des améliorations restent à effectuer afin de tester l'impact sur la microflore modélisée d'additifs réducteurs tels que le carvacrol. L'utilisation du

fermenteur Tryton, permettant un meilleur contrôle de l'anaérobiose que celui obtenu avec le fermenteur Bioflo, couplé à l'ajout d'une molécule au pouvoir anti-oxydant élevé dans le milieu nutritif, devrait conduire à une solution plus adaptée.

A plus long terme, le système devrait être utilisé pour tester l'impact de différents additifs alimentaires apportés de façon successive sur le même inoculum. Dans le cas où la microflore et son activité métabolique se stabiliseraient bien entre chaque traitement, ce modèle pourrait alors être validé pour le « screening » à grande échelle d'additifs alimentaires pouvant remplacer les AFCs.

Ce modèle *in vitro* constitue un outil intéressant, limitant l'expérimentation animale et permettant, dans une étape préliminaire de « pré-screening », de sélectionner dans la liste des additifs alimentaires potentiels, ceux susceptibles de remplacer les AFCs. Cependant, les modèles *in vitro* ne peuvent se substituer totalement aux essais *in vivo*. En effet, les interactions entre l'animal et la microflore, telles que l'attachement des microorganismes à la muqueuse intestinale, la stimulation du système immunitaire, certaines sécrétions intestinales, l'absorption des produits de fermentation, le péristaltisme, ... ne sont pas simulées dans ce système.

Aussi, avant toute mise sur le marché, les molécules sélectionnées *in vitro* devront être testées chez l'animal.

En conclusion,

L'ensemble du travail réalisé dans ce doctorat a permis d'augmenter les connaissances relatives à la microflore du veau de boucherie et de mettre au point un premier système *in vitro* modélisant cet écosystème,

Et même si beaucoup de travail reste encore à réaliser pour mieux définir cet écosystème complexe d'une part, et le modéliser *in vitro* d'autre part,

Les résultats préliminaires sont très prometteurs et ouvrent la porte à de nombreuses autres études.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

- Aarestrup, F.M.** (2000). "Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides." *J Clin Microbiol* **38**(7): 2774-2777.
- Aarestrup, F.M., H. Kruse, E. Tast, A.M. Hammerum and L.B. Jensen** (2000). "Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland, and Norway." *Microb Drug Resist* **6**(1): 63-70.
- Aarestrup, F.M., A.M. Seyfarth, H.D. Emborg, K. Pedersen, R.S. Hendriksen and F. Bager** (2001). "Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(7): 2054-2059.
- Abrams, G.D., H. Bauer and H. Sprinz** (1963). "Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice." *Lab Invest* **12**: 355-364.
- Adams, M. R., S. M. Grubb, A. Hamer, and M. N. Clifford** (1990). "Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on beta-glucuronidase activity." *Appl Environ Microbiol* **56**:2021-2024.
- Aeschbach, R., J. Loliger, B.C. Scott, A. Murcia, J. Butler, B. Halliwell and O.I. Aruoma** (1994). "Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol." *Food Chem Toxicol* **32**(1): 31-36.
- Allison, M. J.** (1978). "Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria." *Appl Environ Microbiol* **35**:872-877.
- Allison, C., C. McFarlan and G.T. MacFarlane** (1989). "Studies on mixed populations of human intestinal bacteria grown in single-stage and multistage continuous culture systems." *Appl Environ Microbiol* **55**(3): 672-678.
- Austgulen, L.T., E. Solheim and R.R. Scheline** (1987). "Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol." *Pharmacol Toxicol* **61**(2): 98-102.

## B

- Backhed, F., R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson and J.I. Gordon** (2005). "Host-bacterial mutualism in the human intestine." *Science* **307**(5717): 1915-1920.

- Bager, F., F.M. Aarestrup, M. Madsen and H.C. Wegener** (1999). "Glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from broilers and pigs following discontinued use of avoparcin." *Microb Drug Resist* **5**(1): 53-56.
- Bampidis, V.A., V. Christodoulou, P. Florou-Paneri, E. Christaki, P.S. Chatzopoulou, T. Tsiligianni and A.B. Spais** (2005). "Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys." *Br Poult Sci* **46**(5): 595-601.
- Barcenilla, A., S.E. Pryde, J.C. Martin, S.H. Duncan, C.S. Stewart, C. Henderson and H.J. Flint** (2000). "Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut." *Appl Environ Microbiol* **66**(4): 1654-1661.
- Barnes, E.M.** (1958). "The effect of antibiotic supplements on the faecal streptococci (Lancefield group D) of poultry." *Br Vet J* **114**: 333-344.
- Barnes, E.M., C.S. Impey and B.J. Stevens** (1979). "Factors affecting the incidence and anti-salmonella activity of the anaerobic caecal flora of the young chick." *J Hyg (Lond)* **82**(2): 263-283.
- Baron, S.F. and P.B. Hylemon** (1997). "Biotransformation of bile acids, cholesterol, and steroid hormones." Dans *Gastrointestinal Microbiology*. R.I. Mackie, B.A. White and R.E. Isaacson, ed. Chapman & Hall, New York, United States.
- Barron, P.** (2002). "Etiopathogénie et prévention de la colibacillose du veau : revue bibliographique." Thèse de Doctorat en Sciences Vétérinaires. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Université Lyon I.
- Baurhoo, B., L. Phillip and C.A. Ruiz-Feria** (2007). "Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens." *Poult Sci* **86**(6): 1070-1078.
- Bedo, S., P. Hagony and J. Harczi** (1976). "Studies of the methods used for the determination of the digestibility of crude fats in calves." *Arch Tierernahr* **26**(3): 179-193.
- Beerens, H.** (1991). "Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent." *Appl Environ Microbiol* **57**:2418-2419.
- Bender, A., G. Breves, J. Stein, S. Leonhard-Marek, B. Schroder and C. Winckler** (2001). "Colonic fermentation as affected by antibiotics and acidic pH: Application of an in vitro model." *Z Gastroenterol* **39**(11): 911-918.



- Berg, R.D. and D.C. Savage** (1975). "Immune responses of specific pathogen-free and gnotobiotic mice to antigens of indigenous and nonindigenous microorganisms." *Infect Immun* **11**(2): 320-329.
- Bergonzelli, G.E., D. Donnicola, N. Porta and I.E. Corthesy-Theulaz** (2003). "Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(10): 3240-3246.
- Biagi, G., A. Piva, M. Moschini, E. Vezzali and F.X. Roth** (2006). "Effect of gluconic acid on piglet growth performance, intestinal microflora, and intestinal wall morphology." *J Anim Sci* **84**(2): 370-378.
- Biesheuvel, M.H., P. G. Bijker and H.A. Urlings** (1991). "Some aspects of the gastrointestinal microflora of veal calves fed different rations: a pilot study." *Vet Q* **13**(2): 97-104.
- Bimczok, D., H. Rau, E. Sewekow, P. Janczyk, W.B. Souffrant and H.J. Rothkotter** (2008). "Influence of carvacrol on proliferation and survival of porcine lymphocytes and intestinal epithelial cells in vitro." *Toxicol In Vitro* **22**(3): 652-658.
- Blanquet, S., J.P. Meunier, M. Minekus, S. Marol-Bonnin and M. Alric** (2003). "Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing P450 in artificial digestive systems: a model for biodegradation in the human digestive environment." *Appl Environ Microbiol* **69**(5): 2884-2892.
- Blanquet, S., E. Zeijdner, E. Beyssac, J.P. Meunier, S. Denis, R. Havenaar and M. Alric** (2004). "A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions." *Pharm Res* **21**(4): 585-591.
- Boerlin, P., A. Wissing, F.M. Aarestrup, J. Frey and J. Nicolet** (2001). "Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs." *J Clin Microbiol* **39**(11): 4193-4195.
- Borgen, K., G.S. Simonsen, A. Sundsfjord, Y. Wasteson, O. Olsvik and H. Kruse** (2000). "Continuing high prevalence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned." *J Appl Microbiol* **89**(3): 478-485.
- Borgen, K., M. Sorum, Y. Wasteson and H. Kruse** (2001). "VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned." *Int J Food Microbiol* **64**(1-2): 89-94.

- Bories, G. and P. Louisot** (1998). "Rapport concernant l'utilisation d'antibiotiques facteurs de croissance en alimentation animale." Rapport présenté au Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation.
- Breves, G., J. Dreyer and H.J. Oslage** (1991). "In vitro-studies on microbial hindgut metabolism in pigs." *Anim Physiol Anim Nutr* **22**(Suppl.): 89-92.
- Bruinsma, N., E. Stobberingh, P. de Smet and A. van den Bogaard** (2003). "Antibiotic use and the prevalence of antibiotic resistance in bacteria from healthy volunteers in the dutch community." *Infection* **31**(1): 9-14.
- Busconi, M., S. Reggi and C. Fogher** (2008). "Evaluation of biodiversity of lactic acid bacteria microbiota in the calf intestinal tracts." *Antonie Van Leeuwenhoek*. **94**(2): 145-155.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, P.W. Cardozo and C. Kamel** (2005). "Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture." *J Dairy Sci* **88**(7): 2508-2516.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret and C. Kamel** (2006). "Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation." *J Dairy Sci* **89**(2): 761-771.
- Butaye, P., L.A. Devriese and F. Haesebrouck** (2003). "Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria." *Clin Microbiol Rev* **16**(2): 175-188.

## C

- Callesen, J.** (2002). "Effects of termination of AGP use on pig welfare and productivity." Abstracts of the International symposium: Beyond antibiotic growth promoters in food animal production, Foulum, Denmark.
- Cant, J.P., B.W. McBride and W.J. Croom, Jr.** (1996). "The regulation of intestinal metabolism and its impact on whole animal energetics." *J Anim Sci* **74**(10): 2541-2553.
- Casewell, M., C. Friis, E. Marco, P. McMullin and I. Phillips** (2003). "The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health." *J Antimicrob Chemother* **52**(2): 159-161.
- Castillo, M., S.M. Martin-Orue, M. Roca, E.G. Manzanilla, I. Badiola, J.F. Perez and J. Gasa** (2006). "The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs." *J Anim Sci* **84**(10): 2725-2734.

- Castro, M., N.V. Ralston, T.I. Morgenthaler, M.S. Rohrbach and A.H. Limper (1994). "Candida albicans stimulates arachidonic acid liberation from alveolar macrophages through alpha-mannan and beta-glucan cell wall components." *Infect Immun* **62**(8): 3138-3145.
- Chadwick, P.R., N. Woodford, E.B. Kaczmarek, S. Gray, R.A. Barrell and B.A. Oppenheim (1996). "Glycopeptide-resistant enterococci isolated from uncooked meat." *J Antimicrob Chemother* **38**(5): 908-909.
- Chandler, P.T. and R.G. Cragle (1962). "Gastrointestinal sites of absorption and endogenous secretion of calcium and phosphorus in dairy calves." *Proc Soc Exp Biol Med* **111**: 431-434.
- Cinquin, C., G. Le Blay, I. Fliss and C. Lacroix (2004). "Immobilization of infant fecal microbiota and utilization in an in vitro colonic fermentation model." *Microb Ecol* **48**(1): 128-138.
- Cinquin, C., G. Le Blay, I. Fliss and C. Lacroix (2006). "New three-stage in vitro model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota." *FEMS Microbiol Ecol* **57**(2): 324-336.
- Clavel, T., D. Borrmann, A. Braune, J. Dore and M. Blaut (2006). "Occurrence and activity of human intestinal bacteria involved in the conversion of dietary lignans." *Anaerobe* **12**(3): 140-147.
- Cleusix, V., C. Lacroix, S. Vollenweider and G. Le Blay (2008). "Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces." *FEMS Microbiol Ecol* **63**(1): 56-64.
- Close, W.H. (2000). "Producing pigs without antimicrobial growth promoters." *Adv Pork Prod* **11**: 47-56.
- Coates, M.E. and R. Fuller (1977). "The gnotobiotic animal in the study of gut microbiology." Dans *Microbial Ecology of the gut*, Clarke and Bauchop eds., London, United Kingdom.
- Coates, M.E., R. Fuller, G.F. Harrison, M. Lev and S.F. Suffolk (1963). "Comparison of the growth of chicks in the Gustafsson germ-free apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin." *Br J Nutr* **17**: 141-151.

- Collado, M.C. and Y. Sanz** (2007). "Quantification of mucosa-adhered microbiota of lambs and calves by the use of culture methods and fluorescent in situ hybridization coupled with flow cytometry techniques." *Vet Microbiol* **121**(3-4): 299-306.
- Collier, C.T., M.R. Smiricky-Tjardes, D.M. Albin, J.E. Wubben, V.M. Gabert, B. Deplancke, D. Bane, D.B. Anderson and H.R. Gaskins** (2003). "Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters." *J Anim Sci* **81**(12): 3035-3045.
- Collignon, P.** (2004). "Antibiotic growth promoters." *J Antimicrob Chemother* **54**(1): 272 ; author reply 276-278.
- Corpet, D.E.** (2000). "Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques." *Revue Méd Vét* **151**(2): 99-104.
- Cox, S.D. and J.L. Markham** (2007). "Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds." *J Appl Microbiol* **103**(4): 930-936.
- Cristani, M., M. D'Arrigo, G. Mandalari, F. Castelli, M.G. Sarpietro, D. Micieli, V. Venuti, G. Bisignano, A. Saija and D. Trombetta** (2007). "Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity." *J Agric Food Chem* **55**(15): 6300-6308.
- Cummings, J.H. and G.T. Macfarlane** (1997). "Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **21**(6): 357-365.

## D

- DANMAP** (1998). "Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food, and humans in Denmark." No 2, Copenhagen, Denmark.
- Daube, G., A. Ginter, C. Manteca, B. Limbourg, P. Coppe, J. Mainil and K. A.** (1996). "L'entérotoxémie bovine: rôle de *Clostridium perfringens*." Publication du Centre d'Etude de l'Entérotoxémie Bovine. Liège.
- Davies, J.** (1994). "Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes." *Science* **264**(5157): 375-382.
- De Boever, P., B. Deplancke and W. Verstraete** (2000). "Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder." *J Nutr* **130**(10): 2599-2606.

- De Ruiter, G.A., A.W. Van Bruggen-Van der Lugt, P. Mischnick, P. Smid, J.H. Van Boom, S.H. Notermans and F.M. Rombouts (1994). "2-O-methyl-D-mannose residues are immunodominant in extracellular polysaccharides of *Mucor racemosus* and related molds." *J Biol Chem* **269**(6): 4299-4306.
- De Rycke, J., S. Bernard, J. Laporte, M. Naciri, M.R. Popoff and A. Rodolakis (1986). "Prevalence of various enteropathogens in the feces of diarrheic and healthy calves." *Ann Rech Vet* **17**(2): 159-168.
- Decuypere, J.A., N.A. Dierick, I.J. Vervaeke and H.K. Henderickx (1991). "Influence of virginiamycin on the digestive physiology in precaecal re-entrant cannulated pigs." *Arch Tierernahr* **41**(4): 373-393.
- Del Grosso, M., A. Caprioli, P. Chinzari, M.C. Fontana, G. Pezzotti, A. Manfrin, E.D. Giannatale, E. Goffredo and A. Pantosti (2000). "Detection and characterization of vancomycin-resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy." *Microb Drug Resist* **6**(4): 313-318.
- Diagnostica PASTEUR (1987). "Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur. Microbiologie, immunologie." 3rd ed. Paris, France.
- Di Pasqua, R., G. Betts, N. Hoskins, M. Edwards, D. Ercolini and G. Mauriello (2007). "Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils." *J Agric Food Chem* **55**(12): 4863-4870.
- Dibner, J.J. and J.D. Richards (2005). "Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action." *Poult Sci* **84**(4): 634-643.
- Didry, N., L. Dubreuil and M. Pinkas (1994). "Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria." *Pharm Acta Helv* **69**(1): 25-28.
- Dierick, N.A., I.J. Vervaeke, J.A. Decuypere and H.K. Henderickx (1978). "Degradation of amino acids by the intestinal microflora of pigs, influence of nutritional doses of virginiamycin and spiramycin." *Proc III World Congress Animal Feeding, Madrid*.
- Dierick, N.A., I.J. Vervaeke, J.A. Decuypere and H.K. Henderickx (1986a). "Influence of the gut flora and some growth-promoting feed additives on nitrogen metabolism in pigs. I. Studies in vitro." *Livest Prod Sci* **14**: 161-176.
- Dierick, N.A., I.J. Vervaeke, J.A. Decuypere and H.K. Henderickx (1986b). "Influence of the gut flora and some growth-promoting feed additives on nitrogen metabolism in pigs. II. Studies in vivo." *Livest Prod Sci* **14**: 177-193.

- Donalson, L.M., W.K. Kim, V.I. Chalova, P. Herrera, C.L. Woodward, J.L. McReynolds, L.F. Kubena, D.J. Nisbet and S.C. Ricke (2007). "In vitro anaerobic incubation of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* and laying hen cecal bacteria in poultry feed substrates and a fructooligosaccharide prebiotic." *Anaerobe* **13**(5-6): 208-214.
- Donovan, D.C., S.T. Franklin, C.C. Chase and A.R. Hippen (2002). "Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or Enteroguard." *J Dairy Sci* **85**(4): 947-950.
- Du, W.X., C.W. Olsen, R.J. Avena-Bustillos, T.H. McHugh, C.E. Levin and M. Friedman (2008). "Storage stability and antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 of carvacrol in edible apple films made by two different casting methods." *J Agric Food Chem* **56**(9): 3082-3088.
- Dubourguier, H.C., M. Contrepois and P. Gouet (1980). "Sécrétion et action des entérotoxines." *Bull. G.T.V.* **4B**: 61-72.
- Ducluzeau, R. and P. Raibaud (1979). "Ecologie microbienne du tube digestif." *Actualités scientifiques de l'INRA*, Editions Masson, Paris, France.
- Duncan, S.H., E.C. Leitch, K.N. Stanley, A.J. Richardson, R.A. Laven, H.J. Flint and C.S. Stewart (2004). "Effects of esculin and esculetin on the survival of *Escherichia coli* O157 in human faecal slurries, continuous-flow simulations of the rumen and colon and in calves." *Br J Nutr* **91**(5): 749-755.
- Durand, D., D. Bauchart, P.M. Laplaud, J. Lefaivre and M.J. Chapman (1990). "Importance of the portal venous pathway to the transport of intestinal triglyceride-rich lipoproteins in the preruminant calf." *Reprod Nutr Dev* **Suppl 2**: 228s.

## E

- Edwards, C.A., B.I. Duerden and N.W. Read (1985). "Metabolism of mixed human colonic bacteria in a continuous culture mimicking the human cecal contents." *Gastroenterology* **88**(6): 1903-1909.
- Elliott, S.D. and E.M. Barnes (1959). "Changes in serological type and antibiotic resistance of Lancefield group D streptococci in chickens receiving dietary chlortetracycline." *J Gen Microbiol* **20**(2): 426-433.

- Elwinger, K., E. Berndtson, B. Engstrom, O. Fossum and L. Waldenstedt (1998). "Effect of antibiotic growth promoters and anticoccidials on growth of *Clostridium perfringens* in the caeca and on performance of broiler chickens." *Acta Vet Scand* **39**(4): 433-441.
- Emborg, H.D., J.S. Andersen, A.M. Seyfarth, S.R. Andersen, J. Boel and H.C. Wegener (2003). "Relations between the occurrence of resistance to antimicrobial growth promoters among *Enterococcus faecium* isolated from broilers and broiler meat." *Int J Food Microbiol* **84**(3): 273-284.
- Everett, S.L., R.P. Kowalski, L.M. Karenchak, D. Landsittel, R. Day and Y.J. Gordon (1995). "An in vitro comparison of the susceptibilities of bacterial isolates from patients with conjunctivitis and blepharitis to newer and established topical antibiotics." *Cornea* **14**(4): 382-387.
- Ewaschuk, J.B., J.M. Naylor, R. Palmer, S.J. Whiting and G.A. Zello (2004). "D-lactate production and excretion in diarrheic calves." *J Vet Intern Med* **18**(5): 744-747.
- Eyssen, H. (1973). "Role of the gut microflora in metabolism of lipids and sterols." *Proc Nutr Soc* **32**(2): 59-63.

## **F**

- Fenollard, F. (1998). "Eubacterium." Dans *Dictionnaire des maladies Infectieuses*, Raoult, D. ed, Elsevier, Paris, France.
- Fey, H., E. Lang, A. Margadant and J. Nicollet (1962). "Zur Pathogenese der Kälber-Colisepsis. VI- Experimentelle Infektion zum Beweis der parenteralen Genese." *Dtsch. Tierarstl. Wschr.* **69**: 581-586.
- Fonty, G. and F. Chaucheyras-Durand (2007). "Les écosystèmes digestifs." *Monographies de microbiologie*, Larpent J.-P. ed, Lavoisier, Paris, France.
- Franklin, M.A., A.G. Mathew, J.R. Vickers and R.A. Clift (2002). "Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age." *J Anim Sci* **80**(11): 2904-2910.
- Fuller, R., M.E. Coates and G.F. Harrison (1979). "The influence of specific bacteria and a filtrable agent of the growth of gnotobiotic chicks." *J Appl Bact* **46**: 335-342.
- Fuller, R., C.B. Cole and M.E. Coates (1984). "The role of *Streptococcus faecium* in antibiotic-relieved growth depression in chickens." *Br Poult Sci* **25**: 395-403.

**Fuller, R., S.B. Houghton and M.E. Coates** (1983). "The effect of dietary penicillin on the growth of gnotobiotic chickens monoassociated with *Streptococcus faecium*." *Br Poult Sci* **24**(1): 111-114.

**Furuse, M. and J. Okumura** (1994). "Nutritional and physiological characteristics in germ-free chickens." *Comp Biochem Physiol A Physiol* **109**(3): 547-556.

**Furuse, M. and H. Yokota** (1985). "Effect of the gut microflora on chick growth and utilisation of protein and energy at different concentrations of dietary protein." *Br Poult Sci* **26**(1): 97-104.

## **G**

**Galfi, P. and J. Bokori** (1990). "Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate." *Acta Vet Hung* **38**(1-2): 3-17.

**Gancarcikova, S., V. Buleca, R. Nemcova, L. Scirankova, J. Koscova and I. Valocky** (2008). "The development of microflora and production of short-chain fatty acids in the digestive tract of suckled piglets and replacer-fed piglets." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **121**(3-4): 121-131.

**Gaskins, H.R.** (2001). "Intestinal bacteria and their influence on swine growth." *Swine Nutrition*. 2nd éd. A.J. Lewis and L.L. Southern, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

**Gérard-Champod, M., S. Blanquet-Diot, L. Mazuranok and M. Alric** (sous presse). "Enumeration of some cultivable bacterial groups and characterization of some abiotic parameters in the jejunoileal content of Prim'Holstein veal calves." *J Anim Sci*.

**Giannenas, I., P. Florou-Paneri, M. Papazahariadou, E. Christaki, N.A. Botsoglou and A.B. Spais** (2003). "Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*." *Arch Tierernahr* **57**(2): 99-106.

**Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid** (1995). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." *J Nutr* **125**(6): 1401-1412.

**Gordon, H.A., E. Bruckner-Kardoss, T.E. Staley, M. Wagner and B.S. Wostmann** (1966). "Characteristics of the germfree rat." *Acta. Anat.* **64**: 367.

**Gordon, H.A. and L. Pesti** (1971). "The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships." *Bacteriol Rev* **35**(4): 390-429.



- Guilloteau, P., I. Le Huerou-Luron, C.-H. Malbert and R. Toullec (1995). "Les sécrétions digestives et leur régulation." Dans Nutrition des Ruminants domestiques, ingestion et digestion. Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M.-H. et Journet M. eds. INRA éditions, Paris.
- Guilloteau, P., R. Toullec, J.F. Grongnet, P. Patureau-Mirand, J. Prugnaud and D. Sauvant (1986). "Digestion of milk, fish and soya-bean protein in the preruminant calf: flow of digesta, apparent digestibility at the end of the ileum and amino acid composition of ileal digesta." Br J Nutr **55**(3): 571-592.
- Guo, F.C., B.A. Williams, R.P. Kwakkel, H.S. Li, X.P. Li, J.Y. Luo, W.K. Li and M.W. Verstegen (2004). "Effects of mushroom and herb polysaccharides, as alternatives for an antibiotic, on the cecal microbial ecosystem in broiler chickens." Poult Sci **83**(2): 175-182.
- Guo, X., D. Li, W. Lu, X. Piao and X. Chen (2006). "Screening of Bacillus strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs." Antonie Van Leeuwenhoek **90**(2): 139-146.

## H

- Hammerum, A.M., O.E. Heuer, C.H. Lester, Y. Agerso, A.M. Seyfarth, H.D. Emborg, N. Frimodt-Moller and D.L. Monnet (2007). "Comment on: withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health." Int J Antimicrob Agents **30**(5): 466-468.
- Hartman, P.A., J.L. Morrill and N.L. Jacobson (1966). "Influence of diet and age on bacterial counts of ileal digesta and feces obtained from young calves." Appl Microbiol **14**(1): 70-73.
- Heinrichs, A.J., C.M. Jones and B.S. Heinrichs (2003). "Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves." J Dairy Sci **86**(12): 4064-4069.
- Helmut, R. and E. Bulling (1985). "Criteria and methods for the microbiological evaluation of growth promoters in animal feeds." Berlin: Bundesunruheitsamt.
- Hess, D.C., W. Lu, J.D. Rabinowitz and D. Botstein (2006). "Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast." PLoS Biol **4**(11): e351.
- Heuer, O.E., K. Pedersen, L.B. Jensen, M. Madsen and J.E. Olsen (2002). "Persistence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in broiler houses after the avoparcin ban." Microb Drug Resist **8**(4): 355-361.

Højberg, O., N. Canibe, B. Knudsen and B.B. Jensen (2003). "Potential rates of fermentation in digesta from the gastrointestinal tract of pigs: effect of feeding fermented liquid feed." *Appl Environ Microbiol* **69**(1): 408-418.

Houghton, S.B., R. Fuller and M.E. Coates (1981). "Correlation of growth depression of chicks with the presence of *Streptococcus faecium* in the gut." *J Appl Bacteriol* **51**(1): 113-120.

House-of-Lords (1998). "Evidence, Resistance to Antibiotics and Other Antimicrobial Agents. Evidence submitted to the House of Lords Select Committee on Science and Technology." The Stationery Office, London: 338.

## I

Imondi, A.R. and F.H. Bird (1966). "The turnover of intestinal epithelium in the chick." *Poult Sci* **45**(1): 142-147.

Ingram, P., R. Lovell, P. Wood, R. Aschaffenberg, S. Bartlett and F.H.B. Roy (1957). "Anticorps anti-Bacterium coli dans le colostrum et taux de survie des veaux." *Ann. Méd. Vét.* **101**: 381-382.

Isenberg, H. D., D. Goldberg and J. Sampson (1970). "Laboratory studies with a selective *Enterococcus* medium." *Appl Microbiol* **20**(3): 433-436.

Ishihara, N., D.C. Chu, S. Akachi and L.R. Juneja (2001). "Improvement of intestinal microflora balance and prevention of digestive and respiratory organ diseases in calves by green tea extracts." *Livest Prod Sci* **68**: 217-229.

## I

Jamroz, D., T. Wiertelcki, M. Houszka and C. Kamel (2006). "Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken." *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **90**(5-6): 255-268.

Jamroz, D., A. Wiliczkieicz, T. Wiertelcki, J. Orda and J. Skorupinska (2005). "Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals." *Br Poult Sci* **46**(4): 485-493.

Jenny, B.F., H.J. Vandijk and J.A. Collins (1991). "Performance and fecal flora of calves fed a *Bacillus subtilis* concentrate." *J Dairy Sci* **74**(6): 1968-1973.

- Jones, F.T. and S.C. Ricke (2003). "Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds." *Poult Sci* **82**(4): 613-617.
- Jouany, J.P. (1982). "Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents." *Sci Aliments* **2**: 131-144.
- Jukes, T.H., D.C. Hill and H.D. Branion (1956). "Effect of feeding antibiotics on the intestinal tract of chicks." *Poult Sci* **35**: 716-723.
- Jukes, T.H., E.L.R. Stokstad, R.R. Taylor, T.J. Cunha, H.M. Edwards and G.B. Meadows (1950). "Growth promoting effect of aureomycin on pigs." *Arch Biochem* **26**: 324-325.
- Juneja, V.K., H. Thippareddi and M. Friedman (2006). "Control of *Clostridium perfringens* in cooked ground beef by carvacrol, cinnamaldehyde, thymol, or oregano oil during chilling." *J Food Prot* **69**(7): 1546-1551.

## K

- Kang, S.J., S.J. Ryu, J.S. Chae, S.K. Eo, G.J. Woo and J.H. Lee (2004). "Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in calves associated with diarrhoea." *Vet Microbiol* **98**(3-4): 323-328.
- Kelly, D.T. and T.P. King (2001). "Luminal bacteria: Regulation of gut function and immunity." Dans *Gut Environment of pigs*. A. Piva, K.E. Bach Knudsen, and J.E. Lindberg, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Kenworthy, R. and W.E. Crabb (1963). "The Intestinal Flora of Young Pigs, with Reference to Early Weaning, *Escherichia Coli* and Scours." *J Comp Pathol* **73**: 215-228.
- Klare, I., D. Badstubner, C. Konstabel, G. Bohme, H. Claus and W. Witte (1999). "Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry." *Microb Drug Resist* **5**(1): 45-52.
- Klare, I., H. Heier, H. Claus, G. Bohme, S. Marin, G. Selmann, R. Hakenbeck, V. Antanassova and W. Witte (1995a). "*Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community." *Microb Drug Resist* **1**(3): 265-272.

- Klare, I., H. Heier, H. Claus, R. Reissbrodt and W. Witte (1995b). "vanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry." FEMS Microbiol Lett **125**(2-3): 165-171.
- Kluge, H., J. Broz and K. Eder (2006). "Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets." J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) **90**(7-8): 316-324.
- Koopman, J.P., H.M. Kennis, J.W. Mullink, R.A. Prins, A.M. Stadhouders, H. De Boer and M.P. Hectors (1984). "'Normalization' of germfree mice with anaerobically cultured caecal flora of 'normal' mice." Lab Anim **18**(2): 188-194.
- Krul, C., C. Humblot, C. Philippe, M. Vermeulen, M. van Nuenen, R. Havenaar and S. Rabot (2002). "Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large-intestinal model." Carcinogenesis **23**(6): 1009-1016.
- Kyriakis, S.C., K. Sarris, S.K. Kritas, K. Saoulidis, A.C. Tsinas and V.K. Tsiloyiannis (1995). "The effect of salinomycin on the control of *Clostridium perfringens* type-A infection in growing pigs." Zentralbl Veterinarmed B **42**(6): 355-359.

## L

- Lambert, R.J., P.N. Skandamis, P.J. Coote and G.J. Nychas (2001). "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol." J Appl Microbiol **91**(3): 453-462.
- Lan, P.T., M. Sakamoto and Y. Benno (2004). "Effects of two probiotic *Lactobacillus* strains on jejunal and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes." Microbiol Immunol **48**(12): 917-929.
- Larvor, P. (1980). "Evolution du concept de gastro-entérite néonatale." Bull. G.T.V. **4B**: 3-8.
- Lebrun, M., P. Filee, B. Mousset, D. Desmecht, M. Galleni, J.G. Mainil and A. Linden (2007). "The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome." Vet Microbiol **120**(1-2): 151-157.

- Lee, J.H., J. Hur and B.D. Stein (2007). "Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 and O111 in calves associated with diarrhea." *Vet J* **176**(2): 205-209.
- Leedle, J.A. and R.B. Hespell (1980). "Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations." *Appl Environ Microbiol* **39**(4): 709-719.
- Leeson, S., H. Namkung, M. Antongiovanni and E.H. Lee (2005). "Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens." *Poult Sci* **84**(9): 1418-1422.
- Leshner, S., H.E. Walburg, Jr. and G.A. Sacher, Jr. (1964). "Generation Cycle in the Duodenal Crypt Cells of Germ-Free and Conventional Mice." *Nature* **202**: 884-886.
- Levy, S.B. (1994). "Balancing the drug-resistance equation." *Trends Microbiol* **2**(10): 341-342.
- Liu, P.V. and H.C. Hsieh (1969). "Inhibition of protease production of various bacteria by ammonium salts: its effect on toxin production and virulence." *J Bacteriol* **99**(2): 406-413.
- Lopez, S., C. Valdes, C.J. Newbold and R.J. Wallace (1999). "Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation in vitro." *Br J Nutr* **81**(1): 59-64.
- Luecke, W. (1950). "The effect of vitamin B12, animal protein factor and streptomycin on the growth of young pigs." *Arch Biochem* **26**: 326-327.
- Lukas, F., I. Koppova, V. Kudrna and J. Kopečný (2007). "Postnatal development of bacterial population in the gastrointestinal tract of calves." *Folia Microbiol (Praha)* **52**(1): 99-104.
- Lundstrom, K., B. Malmfors, G. Malmfors, S. Stern, H. Petersson, A.B. Mortensen and S.E. Sorenson (1988). "Skatole, androstenone and taint in boars fed two different diets." *Livest Prod Sci* **18**: 55.

## M

- Macfarlane, G.T., S. Macfarlane and G.R. Gibson (1998). "Validation of a Three-Stage Compound Continuous Culture System for Investigating the Effect of Retention Time on the Ecology and Metabolism of Bacteria in the Human Colon." *Microb Ecol* **35**(2): 180-187.

- Mackie, R.I., A. Sghir and H.R. Gaskins (1999). "Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract." *Am J Clin Nutr* **69**(5): 1035S-1045S.
- Mackie, R. I. and S. Heath (1979). "Enumeration and Isolation of Lactate-Utilizing Bacteria from the Rumen of Sheep." *Appl Environ Microbiol* **38**(3): 416-421.
- Mainil, J.G., C.J. Duchesnes, S.C. Whipp, L.R. Marques, A.D. O'Brien, T.A. Casey and H.W. Moon (1987). "Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea." *Am J Vet Res* **48**(5): 743-748.
- Mallett, A.K., C.A. Bearne, I.R. Rowland, M.J. Farthing, C.B. Cole and R. Fuller (1987). "The use of rats associated with a human faecal flora as a model for studying the effects of diet on the human gut microflora." *J Appl Bacteriol* **63**(1): 39-45.
- Mallett, A.K., I. Rowland, C.A. Bearne, J.C. Flynn, B.J. Fehilly, S. Udeen and M.J.G. Farthing (1988). "Effect of dietary supplements of apple pectin, wheat bran or fat on the enzyme activity of the human faecal microflora." *Microb Ecol Health Dis* **1**.
- Manteca, C. (2003). "Etude étiologique de l'entérotoxémie bovine." Thèse de doctorat en sciences vétérinaires. Université de Liège. Belgique.
- Manteca, C., G. Daube, T. Jauniaux, A. Linden, V. Pirson, J. Detilleux, A. Ginter, P. Coppe, A. Kaeckenbeeck and J.G. Mainil (2002). "A role for the *Clostridium perfringens* beta2 toxin in bovine enterotoxaemia?" *Vet Microbiol* **86**(3): 191-202.
- Manteca, C., G. Daube and J. Mainil (1999). "Study of the role of *Clostridium perfringens* in bovine enterotoxemia." *Bull Mem Acad R Med Belg* **154**(6 Pt 2): 319-325.
- Manteca, C., G. Daube, V. Pirson, B. Limbourg, A. Kaeckenbeeck and J.G. Mainil (2001). "Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves." *Vet Microbiol* **81**(1): 21-32.
- Manzanilla, E.G., M. Nofrarias, M. Anguita, M. Castillo, J.F. Perez, S.M. Martin-Orue, C. Kamel and J. Gasa (2006). "Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs." *J Anim Sci* **84**(10): 2743-2751.
- Manzanilla, E.G., J.F. Perez, M. Martin, C. Kamel, F. Baucells and J. Gasa (2004). "Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs." *J Anim Sci* **82**(11): 3210-3218.
- Marteau, P., M. Minekus, R. Havenaar and J.H. Huis in't Veld (1997). "Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile." *J Dairy Sci* **80**(6): 1031-1037.

- Mastelic, J., I. Jerkovic, I. Blazevic, M. Poljak-Blazi, S. Borovic, I. Ivancic-Bace, V. Smrecki, N. Zarkovic, K. Brcic-Kostic, D. Vikic-Topic and N. Muller (2008).** "Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives." *J Agric Food Chem* **56**(11): 3989-3996.
- Mathieu, C.M. and P.E. Barre (1964).** "Digestion et utilisation des aliments par le veau pré-ruminant à l'engrais. I. Utilisation des laits entiers ou partiellement écrémés." *Ann Bioch Biophys* **4**: 403-422.
- McBain, A.J. and G.T. Macfarlane (1997).** "Investigations of bifidobacterial ecology and oligosaccharide metabolism in a three-stage compound continuous culture system." *Scand J Gastroenterol Suppl* **222**: 32-40.
- McCracken, V.J. and H.R. Gaskins (1999).** "Probiotics and the immune system." Dans *Probiotics: A critical review*; G.W. Tannock, ed. Horizon Scientific Press, Norfolk, UK.
- Mead, G.C. (1997).** "Bacteria in the gastrointestinal tract of birds." Pages 216-242 in *Gastrointestinal Microbiology*, val. 2. Mackie R.I., White B.A. et Isaacson R.E., eds, Chapman & Hall, London, UK.
- Merz, W. G., G. Sandford, and G.L. Evans (1976).** "Clinical evaluation of the addition of gentamicin to commercially prepared mycological media." *J Clin Microbiol* **3**(5): 496-500.
- Meunier, J.P., J.M. Cardot, E.G. Manzanilla, M. Wysshaar and M. Alric (2007).** "Use of spray-cooling technology for development of microencapsulated capsicum oleoresin for the growing pig as an alternative to in-feed antibiotics: a study of release using in vitro models." *J Anim Sci* **85**(10): 2699-2710.
- Michel, M., A.C. Francois and M. Lemoigne (1955).** "Relation entre l'influence des antibiotiques sur la croissance du porc et l'inhibition des desaminases de la flore intestinale." *CR Acad Sci* **240**: 808-810.
- Miller, T.L. and M.J. Wolin (1981).** "Fermentation by the human large intestine microbial community in an in vitro semicontinuous culture system." *Appl Environ Microbiol* **42**(3): 400-407.
- Milon, A., E. Oswald and J. De Rycke (1999).** "Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*." *Vet Res* **30**(2-3): 203-219.

- Minekus, M., M. Smeets-Peeters, A. Bernalier, S. Marol-Bonnin, R. Havenaar, P. Marteau, M. Alric, G. Fonty and J.H. Huis in't Veld** (1999). "A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products." *Appl Microbiol Biotechnol* **53**(1): 108-114.
- Montagne, L., R. Toullec and J.P. Lalles** (2000). "Calf intestinal mucin: isolation, partial characterization, and measurement in ileal digesta with an enzyme-linked immunosorbent assay." *J Dairy Sci* **83**(3): 507-517.
- Moore, P.R., A. Evenson, T.D. Luckey, E. McCoy, C.A. Elvehjem and E.B. Hart** (1946). "Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick." *J Biol Chem* **165**: 437-441.
- Moore, W.E. and L.V. Holdeman** (1974). "Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians." *Appl Microbiol* **27**(5): 961-979.
- Moreau, M.C., P. Raibaud and M.C. Muller** (1982). "Relation entre le développement du système immunitaire intestinal à IgA et l'établissement de la flore microbienne dans le tube digestif du souriceau holoxénique." *Ann. Immunol.* **133D**: 29-39.
- Muhl, A. and F. Liebert** (2007). "Growth and parameters of microflora in intestinal and faecal samples of piglets due to application of a phytogenic feed additive." *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **91**(9-10): 411-418.
- Muller, T., B. Walter, A. Wirtz and A. Burkovski** (2006). "Ammonium toxicity in bacteria." *Curr Microbiol* **52**(5): 400-406.
- Muscato, T.V., L.O. Tedeschi and J.B. Russell** (2002). "The effect of ruminal fluid preparations on the growth and health of newborn, milk-fed dairy calves." *J Dairy Sci* **85**(3): 648-656.
- Mylrea, P.J.** (1966). "Digestion of milk in young calves. II. The absorption of nutrients from the small intestine." *Res Vet Sci* **7**(4): 394-406.

## N

- Nagaraja, T.G., M.B. Taylor, D.L. Harmon and J.E. Boyer** (1987). "In vitro lactic acid inhibition and alterations in volatile fatty acid production by antimicrobial feed additives." *J Anim Sci* **65**(4): 1064-1076.
- Nataro, J.P. and J.B. Kaper** (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." *Clin Microbiol Rev* **11**(1): 142-201.



**Niewold, T.A.** (2007). "The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis." *Poult Sci* **86**(4): 605-609.

**Nofrarias, M., E.G. Manzanilla, J. Pujols, X. Gibert, N. Majo, J. Segales and J. Gasa** (2006). "Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs." *J Anim Sci* **84**(10): 2735-2742.

## O

**Okumura, J., D. Hewitt, D.N. Salter and M.E. Coates** (1976). "The role of the gut microflora in the utilization of dietary urea by the chick." *Br J Nutr* **36**(2): 265-272.

**Olumeyan, D.B., T.G. Nagaraja, G.W. Miller, R.A. Frey and J.E. Boyer** (1986). "Rumen microbial changes in cattle fed diets with or without salinomycin." *Appl Environ Microbiol* **51**(2): 340-345.

**Omole, O.O., G. Nappert, J.M. Naylor and G.A. Zello** (2001). "Both L- and D-lactate contribute to metabolic acidosis in diarrheic calves." *J Nutr* **131**(8): 2128-2131.

**Ozawa, K., K. Yabu-uchi, K. Yamanaka, Y. Yamashita, S. Nomura and I. Oku** (1983). "Effect of *Streptococcus faecalis* BIO-4R on intestinal flora of weanling piglets and calves." *Appl Environ Microbiol* **45**(5): 1513-1518.

## P

**Page, S.W.** (2006). "Current use of antimicrobial growth promoters in food animals: The benefits." Dans *Antimicrobial Growth Promoters: Where do we go from here?* D. Barug, J. de Jong, A.K. Kies and M. Verstegen, eds. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Pays-Bas.

**Partanen, K.H. and Z. Mroz** (1999). "Organic acids for performance enhancement in pig diets." *Nutr Res Rev* **12**(1): 117-145.

**Pavaux, Cl.** (1977). "Rappels anatomiques." Dans *Le veau - Anatomie, Physiologie, Elevage, Alimentation, Production, Pathologie*. P. Mornet, Espinasse J. and coll., eds, Maloine S.A. Editeur, Paris, France

**Pedersen, K. and G.W. Tannock** (1989). "Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli." *Appl Environ Microbiol* **55**(2): 279-283.

- Pelmont, J.** (1993). "13 - Fermentation du glucose, 14 - Fermentations en tout genre." Dans Bactéries et environnement - Adaptations physiologiques. Presses universitaires de Grenoble, EDP Sciences Ed., Grenoble, France.
- Petersen, J.S.** (2002). "Animal welfare and health as affected by management procedures in commercial broiler flocks." The International Invitational Symposium: Beyond Growth Promoters in Food Animal Production, Foulum, Denmark.
- Phillips, I.** (2007). "Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health." *Int J Antimicrob Agents* **30**(2): 101-107.
- Piccaglia, R., M. Marotti, E. Giovanelli, S.G. Deans and E. Eaglesham** (1993). "Antibacterial and anti-oxidant properties of medditarian aromatic plants." *Indust Crops and Prod* **2**: 47-50.
- Piva, A. and E. Grilli** (2007). "Role of benzoic, lactic and sorbic acid in in vitro swine cecal fermentation." *Vet Res Commun* **31 Suppl 1**: 401-404.
- Piva, A., E. Grilli, L. Fabbri, V. Pizzamiglio, P.P. Gatta, F. Galvano, M. Bognanno, L. Fiorentini, J. Wolinski, R. Zabielski and J.A. Patterson** (2008). "Intestinal metabolism of weaned piglets fed either a typical United States or European diet with or without supplementation of tributyrin and lactitol." *J Anim Sci* **86**(11): 2952-61.
- Piva, G. and F. Rossi** (1999). "Possible alternatives to the use of antibiotics as growth promoters. New additives." *CIHEAM-IAMZ - Option Méditerranéenne*: 83-106.
- Pond, W.G. and J.T. Yen** (1987). "Effect of supplemental carbadox, an antibiotic combination, or clinoptilolite on weight gain and organ weights of growing swine fed maize or rye as the grain sources." *Nutr Rep Int* **35**: 801-809.
- Porter, P. and R. Kenworthy** (1969). "A study of intestinal and urinary amines in pigs in relation to weaning." *Res Vet Sci* **10**(5): 440-447.
- Powell, L.W., M.E. Coates, R. Fuller, G.F. Harrison and D.J. Jayne-Williams** (1974). "The role of *Clostridium perfringens* in the growth response of chicks to dietary penicillin." *J Appl Bacteriol* **37**(3): 427-435.
- Prescott, L.M., J.P. Harley and D.A. Klein** (2003). "Microbiologie." Edition De Boeck, Bruxelles, Belgique.

## Q

- Quigley, J.D., 3rd, J.J. Drewry, L.M. Murray and S.J. Ivey (1997). "Body weight gain, feed efficiency, and fecal scores of dairy calves in response to galactosyl-lactose or antibiotics in milk replacers." *J Dairy Sci* **80**(8): 1751-1754.
- Quigley, J.D., 3rd, C.J. Kost and T.A. Wolfe (2002). "Effects of spray-dried animal plasma in milk replacers or additives containing serum and oligosaccharides on growth and health of calves." *J Dairy Sci* **85**(2): 413-421.
- Quigley, J.D., 3rd and T.M. Wolfe (2003). "Effects of spray-dried animal plasma in calf milk replacer on health and growth of dairy calves." *J Dairy Sci* **86**(2): 586-592.
- Quigley, J.D., III, T.M. Steen and S.I. Boehms (1992). "Postprandial changes of selected blood and ruminal metabolites in ruminating calves fed diets with or without hay." *J Dairy Sci* **75**(1): 228-235.

## R

- Rada, V., E. Vlkova, J. Nevoral and I. Trojanova (2006). "Comparison of bacterial flora and enzymatic activity in faeces of infants and calves." *FEMS Microbiol Lett* **258**(1): 25-28.
- Rader, J.I., K.A. Wolnik, C.M. Gaston, E.M. Celesk, J.T. Peeler, M.R. Fox and F.L. Fricke (1984). "Trace element studies in weanling rats: maternal diets and baseline tissue mineral values." *J Nutr* **114**(10): 1946-1954.
- Renault, L., M. Palisse and P. Bonnet (1977). "Troubles gastro-intestinaux infectieux." Dans *Le veau - Anatomie, Physiologie, Elevage, Alimentation, Production, Pathologie*. P. Mornet, Espinasse J. and coll., eds, Maloine S.A. Editeur, Paris, France.
- Rerat, A. (1965). "Influence des antibiotiques sur la rétention azotée chez le rat en croissance." *Ann Biol Anim Bioch Biophys* **5**: 41-51.
- Richards, J.D., J. Gong and C.F.M. de Lange (2005). "The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies." *Can J Anim Sci* **85**: 421-435.
- Roberts, A. K., R. Chierici, G. Sawatzki, M.J. Hill, S. Volpato and V. Vigi (1992). "Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin: 1. Effect on the infant faecal flora." *Acta Paediatr* **81**(2): 119-124.

- Rogosa, M., J.A. Mitchell and R.F. Wiseman** (1951). "A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli." *J Bacteriol* **62**(1): 132-133.
- Ross, Z.M., E.A. O'Gara, D.J. Hill, H.V. Sleightholme and D.J. Maslin** (2001). "Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder." *Appl Environ Microbiol* **67**(1): 475-480.
- Rothkotter, H.J., T. Kirchhoff and R. Pabst** (1994). "Lymphoid and non-lymphoid cells in the epithelium and lamina propria of intestinal mucosa of pigs." *Gut* **35**(11): 1582-1589.
- Royer, E., C. Gourmelen and Y. Rugraff** (2001). "Bannissement des facteurs de croissance antibiotiques en europe - quelles conséquences pour les producteurs de porcs?" *Porc Quebec*.
- Ruckebusch, Y.** (1977a). "Physiologie digestive." Dans *Le veau - Anatomie, Physiologie, Elevage, Alimentation, Production, Pathologie*. P. Mornet, Espinasse J. and coll., eds, Maloine S.A. Editeur, Paris, France.
- Ruckebusch, Y.** (1977b). "Thermorégulation." Dans *Le veau - Anatomie, Physiologie, Elevage, Alimentation, Production, Pathologie*. P. Mornet, Espinasse J. and coll., eds, Maloine S.A. Editeur, Paris, France.
- Rumney, C.J. and I.R. Rowland** (1992). "In vivo and in vitro models of the human colonic flora." *Crit Rev Food Sci Nutr* **31**(4): 299-331.
- Russell, J.B.** (1983). "Fermentation of Peptides by *Bacteroides ruminicola* B(1)4." *Appl Environ Microbiol* **45**(5): 1566-1574.

## S

- Sakata, T. and A. Inagaki** (2001). "Organic acid production in the large intestine: implication for epithelial cell proliferation and cell death." Dans *Gut Environment of Pigs*. A. Piva, K.E. Bach Knudsen, and J.E. Lindberg, ed. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom.
- Sakata, T., T. Kojima, M. Fujieda, M. Takahashi and T. Michibata** (2003). "Influences of probiotic bacteria on organic acid production by pig caecal bacteria in vitro." *Proc Nutr Soc* **62**(1): 73-80.
- Salter, D.N., M.E. Coates and D. Hewitt** (1974). "The utilization of protein and excretion of uric acid in germ-free and conventional chicks." *Br J Nutr* **31**(3): 307-318.

- Samanidou, V.F. and E.N. Evaggelopoulou** (2008). "Chromatographic analysis of banned antibacterial growth promoters in animal feed." *J Sep Sci* **31**(11): 2091-2112.
- Sautet, J.** (1995). "L'appareil digestif et ses adaptations." Dans *Nutrition des Ruminants domestiques, ingestion et digestion*. Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M.-H. et Journet M. eds. INRA éditions, Paris.
- Savage, D.C.** (1977). "Microbial ecology of the gastrointestinal tract." *Annu Rev Microbiol* **31**: 107-133.
- Savage, D.C.** (1986). "Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition." *Annu Rev Nutr* **6**: 155-178.
- Schelcher, F., J. De Rycke, J.L. Martel, J.F. Valarcher and J. Espinasse** (1993). "Diarrhées colibacillaires néonatales du veau." *Point Vét.* **25**: 611-623.
- Schouten, M.A. and A. Voss** (1997). "VRE and meat." *Lancet* **349**: 1258.
- Schulze, F. and H. Gunther** (1978). "Studies on diarrhea of young calves. 1. Quantitative analysis of the gastrointestinal flora in clinically healthy calves and in calves with diarrhea." *Arch Exp Veterinarmed* **32**(2): 251-272.
- Schulze, F. and H.E. Jacob** (1981). "Diarrhea in young calves. 4. Redox potential of the gastrointestinal tract of clinically healthy calves, and calves with spontaneous diarrhea, experimental *Escherichia coli* infection, and cyclophosphamide treatment." *Arch Exp Veterinarmed* **35**(3): 337-348.
- Seeliger, S., P.H. Janssen and B. Schink** (2002). "Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA." *FEMS Microbiol Lett* **211**(1): 65-70.
- Serieys, F.** (1993). "Le colostrum de vache. Bien le connaître pour mieux l'utiliser." SmithKline Beecham Ed., United Kingdom.
- Shimomura, Y. and H. Sato** (2006). "Fecal D- and L- lactate, succinate, and volatile fatty acid levels in young dairy calves." *J Vet Med Sci* **68**(9): 973-977.
- Slyter, L.L., W.O. Nelson and M.J. Wolin** (1964). "Modifications of a Device for Maintenance of the Rumen Microbial Population in Continuous Culture." *Appl Microbiol* **12**: 374-377.

- Smiricky-Tjardes, M.R., C.M. Grieshop, E.A. Flickinger, L.L. Bauer and G.C. Fahey, Jr.** (2003). "Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs." *J Anim Sci* **81**(10): 2535-2545.
- Smith, R.H.** (1962). "Net exchange of certain inorganic ions and water in the alimentary tract of the milk-fed calf." *Biochem J* **83**: 151-163.
- Snel, J., H.J.M. Harmssen, P.W.J.J. van der Wielen and B.A. Williams** (2002). "Dietary strategies to influence the gastrointestinal microflora of young animals, and its potential to improve intestinal health." Dans *Nutrition and Health of the Gastrointestinal Tract*. M.C. Blok, H.A. Vahl, L. de Lange; A.E. van de Braak, G. Hemke, and M. Hessind, eds. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Pays-Bas.
- Sorensen, M.** (1979). "Occurrence and distribution of antibiotic resistant *E. coli* strains in faeces from young pigs and calves in Denmark." *Nord Vet Med* **31**(1): 25-34.
- Starr, M.P. and D.M. Reynolds** (1951). "Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin." *Am J Public Health Nations Health* **41**(11 Pt 1): 1375-1380.
- Stein, H.H. and D.Y. Kil** (2006). "Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 2." *Anim Biotechnol* **17**(2): 217-231.
- Stordeur, P., B. China, G. Charlier, S. Roels and J. Mainil** (2000). "Clinical signs, reproduction of attaching/effacing lesions, and enterocyte invasion after oral inoculation of an O118 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves." *Microbes Infect* **2**(1): 17-24.
- Stuart, J.G. and J.J. Ferretti** (1978). "Genetic analysis of antibiotic resistance in *Streptococcus pyogenes*." *J Bacteriol* **133**(2): 852-859.
- Summers, M.** (1991). "Energy metabolism in the broiler chick." Ph.D. Thesis. University of Guelph, Ontario, Canada.
- Swann-Committee** (1969). "Report of the joint Committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine." Her Majestys Stationery Office, London, United Kingdom.

## **T**

- Tamate, H., A.D. McGilliard, N.L. Jacobson and R. Getty** (1962). "Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach of the calf." *J. Dairy Sci.* **45**: 408.
- Tannock, G.W.** (1997). "Normal microbiota of the gastrointestinal tract of rodents." Dans *Gastrointestinal Microbiology*, val. 2. Mackie R.I., White B.A. et Isaacson R.E., eds, Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- The-European-parliament-and-the-council** (2003). "Regulation (EC) No 1831/2003 of the european parliament and of the council of 22 september 2003 on additives use in animal nutrition." Official journal of the European Union.
- Thivend, P.** (1976). "L'utilisation digestive des glucides par le veau pré-ruminant." *Ind Alim Anim* **1**: 19-33.
- Thivend, P. and R. Toullec** (1977). "Digestion, absorption et métabolisme des nutriments." Dans *Le veau - Anatomie, Physiologie, Elevage, Alimentation, Production, Pathologie*. P. Mornet, Espinasse J. and coll., eds, Maloine S.A. Editeur, Paris, France.
- Timmerman, H.M., L. Mulder, H. Everts, D.C. van Espen, E. van der Wal, G. Klaassen, S.M. Rouwers, R. Hartemink, F.M. Rombouts and A.C. Beynen** (2005). "Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics." *J Dairy Sci* **88**(6): 2154-2165.
- Tornee, N.** (2002). "Consequences of terminating AGP use for broiler health and usage of antimicrobials for therapy and prophylaxis." Abstracts of the International symposium: Beyond antibiotic growth promoters in food animal production, Foulum, Denmark: 6.
- Toullec, R., D. Bauchart, G. Bertrand, J.F. Hocquette and F. Meschy** (2003). "Les aliments d'allaitement." Dans *Le Veau de Boucherie*, Veissier, I., Bertrand, G., Toullec, R. eds, INRA éditions, Paris, France.
- Toullec, R. and J.P. Lalles** (1995). "Digestion dans la caillette et l'intestin grêle." Dans *Nutrition des Ruminants domestiques, ingestion et digestion*. Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M.-H. et Journet M. eds. INRA éditions, Paris.

## U

- Ultee, A. and E.J. Smid (2001). "Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*." *Int J Food Microbiol* **64**(3): 373-378.
- Umesaki, Y., H. Setoyama, S. Matsumoto, A. Imaoka and K. Itoh (1999). "Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system." *Infect Immun* **67**(7): 3504-3511.
- Umesaki, Y., H. Setoyama, S. Matsumoto and Y. Okada (1993). "Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus." *Immunology* **79**(1): 32-37.

## V

- van den Bogaard, A.E., N. Bruinsma and E.E. Stobberingh (2000). "The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands." *J Antimicrob Chemother* **46**(1): 146-148.
- van Der Wielen, P.W., S. Biesterveld, S. Notermans, H. Hofstra, B.A. Urlings and F. van Knapen (2000). "Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth." *Appl Environ Microbiol* **66**(6): 2536-2540.
- van Leeuwen, W.J., J. van Embden, P.A. Guinee, E.H. Kampelmacher, A. Manten, M. van Schothorst and C.E. Voogd (1979). "Reduction of the number of tetracycline-resistant strains of *Salmonella* in the Netherlands." *Tijdschr Diergeneeskde* **104**(23): 923-927.
- Veissier, I. and B.J. Lensink (2003). "Qu'est- ce qu'un veau de boucherie ? Qu'est-ce que le bien-être animal ?" Dans *Le Veau de Boucherie*, Veissier, I., Bertrand, G., Toullec, R. eds, INRA éditions, Paris, France.
- Veldman, A. and P.J. van der Aar (1997). "Effects of dietary inclusion of a natural clinoptilolite (mannelite) on piglet performance." *Agribiol Res* **50**: 289-294.
- Verner Wheelock, J. and C. Foster (2002). "Food safety and pig production in Denmark." Danish Bacon and Meat Council. Verner Wheelock Associates Ltd, Skipton, UK.
- Vervaeke, I.J., J.A. Decuypere, N.A. Dierick and H.K. Henderickx (1978). "The influence of growth promoting antibiotics on the energy metabolism of pigs." *Int Vet Assoc Foc Anim Production* **8**: 23-27.



- Vervaeke, I.J., J.A. Decuypere, N.A. Dierick and H.K. Henderickx** (1979). "Quantitative in vitro evaluation of the energy metabolism influenced by virginiamycin and spiramycin used as growth promoters in pig nutrition." *J Anim Sci* **49**: 846-856.
- Vissek, W.J.** (1964). "Urease Immunity in Liver Disease: a New Approach." *Gastroenterology* **46**: 326-329.
- Vissek, W.J.** (1978a). "Diet and cell growth modulation by ammonia." *Am J Clin Nutr* **31**(Suppl 10): S216-S220.
- Vissek, W.J.** (1978b). "The mode of growth promotion by antibiotics." *J Anim Sci* **46**: 1447-1469.
- Vlkova, E., I. Trojanova and V. Rada** (2006). "Distribution of bifidobacteria in the gastrointestinal tract of calves." *Folia Microbiol (Praha)* **51**(4): 325-328.

## W

- Wallace, R.J. and C.J. Newbold** (1992). "Probiotics for ruminants." Dans *Probiotics - the Scientific Basis* (Fuller R., ed.), Chapman & Hall, London.
- Walter, B.M. and G. Bilkei** (2004). "Immunostimulatory effect of dietary oregano etheric oils on lymphocytes from growth-retarded, low-weight growing-finishing pigs and productivity." *Tijdschr Diergeneeskd* **129**(6): 178-181.
- Ward, G.E.** (1981). "Gastrointestinal microflora of calves fed fermented colostrum." *Am. J. Vet. Res.* **42**(9): 1491-1493.
- Warner, R.G., W.P. Flatt and J.K. Loosli** (1956). "Dietary factors affecting development of the ruminant stomach." *J. Agr. Food Chem.* **4**: 788.
- Wegener, H.C.** (2002). "Banning antimicrobial growth promoters in Europe: where does it make a difference?" 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, CA, 2002. **Abstract for session 195**: American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Welton, L.A., L.A. Thal, M.B. Perri, S. Donabedian, J. McMahon, J.W. Chow and M.J. Zervos** (1998). "Antimicrobial resistance in enterococci isolated from Turkey flocks fed virginiamycin." *Antimicrob Agents Chemother* **42**(3): 705-708.

- Werner, G., I. Klare, H. Heier, K.H. Hinz, G. Bohme, M. Wendt and W. Witte (2000). "Quinupristin/dalfopristin-resistant enterococci of the satA (vatD) and satG (vatE) genotypes from different ecological origins in Germany." *Microb Drug Resist* **6**(1): 37-47.
- Werner, G., I. Klare and W. Witte (1998). "Association between quinupristin/dalfopristin resistance in glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* and the use of additives in animal feed." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**(6): 401-402.
- Wierup, M. (2001). "The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health, disease prevention, productivity, and usage of antimicrobials." *Microb Drug Resist* **7**(2): 183-190.
- Witte, W. (1997). "Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans." *Ciba Found Symp* **207**: 61-71; discussion 71-65.
- Witte, W., I. Klare and G. Werner (1999). "Selective pressure by antibiotics as feed additives." *Infection* **27**(Suppl 2): S35-38.

## X

- Xu, H., M. Delling, J.C. Jun and D.E. Clapham (2006). "Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels." *Nat Neurosci* **9**(5): 628-635.

## Y

- Yang, M.G. and J.W. Thomas (1965). "Absorption and secretion of some organic and inorganic constituents and the distribution of these constituents throughout the alimentary tract of young calves." *J Nutr* **87**(4): 444-458.
- Yokoyama, M.T., C. Tabori, E.R. Miller and M.G. Hogberg (1982). "The effects of antibiotics in the weanling pig diet on growth and the excretion of volatile phenolic and aromatic bacterial metabolites." *Am J Clin Nutr* **35**(6): 1417-1424.

## Z

- Ziolecki, A., E. Kwiatkowska and H. Laskowska (1984). "The effect of Stabilized Rumen Extract on growth and development of calves. 2. Digestive activity in the rumen and development of microflora in the rumen and faeces." *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd* **51**(1-2): 20-31.

## Sites internet :

- [1] Centre d'Information des Viandes : L'élevage du veau, <http://www.civ-viande.org/file/brochure2/elevage-veaux.pdf>
- [2] Office de l'élevage : Le marché du veau en France, <http://www.office-elevage.fr/publications/marche2008/pdf/Veau/veau-fr.pdf>
- [3] Office de l'élevage : Le marché du veau dans l'Union Européenne, <http://www.office-elevage.fr/publications/marche2008/pdf/Veau/veau-ue.pdf>
- [4] Euzéby, J.P., Dictionnaire de bactériologie vétérinaire : *Eubacterium*, *Eubacterium tarantallae*, *Eubacterium Tortuosum*,  
<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ee/eubacterium.html>
- [5] Marie-Elisabeth Bougnoux : Diversité génétique de *Candida albicans*, levure pathogène opportuniste,  
<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000020-014>
- [6] Pancosma : X-tract™ poultry,  
<http://www.xtract.cc/french/poultry/modeofaction.html>

## ANNEXES

# Annexe I : Journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Avril 2007, Clermont-Ferrand, France.

4<sup>ème</sup> Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois 29 mars 2007



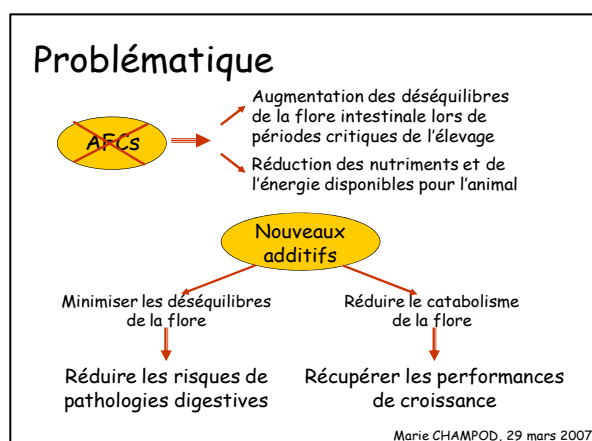
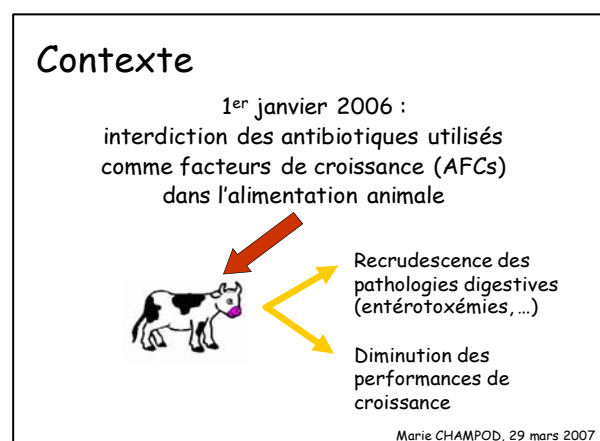
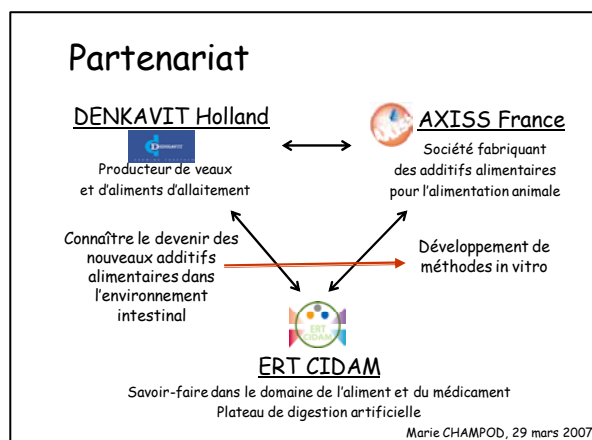
**MISE EN PLACE  
D'UN SYSTEME *IN VITRO* MODELISANT  
L'ENVIRONNEMENT JEJUNO-ILEAL  
DU VEAU DE BOUCHERIE**

Développement de nouveaux additifs alimentaires  
comme alternative aux antibiotiques facteurs de croissance

Marie CHAMPOD, Stéphanie BLANQUET-DIOT,  
Sylvain DENIS, Monique ALRIC



Equipe de Recherche Technologique  
« Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament »



## Mise en place d'un système *in vitro* permettant la modélisation de l'équilibre bactérien de l'environnement jéjuno-iléal du veau de boucherie

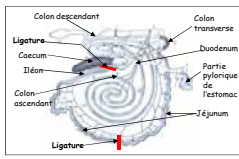


1<sup>ère</sup> étape :  
Caractérisation de la flore jéjuno-iléale  
du veau de boucherie

Marie CHAMPOD, 29 mars 2007

## Caractérisation de la flore bactérienne

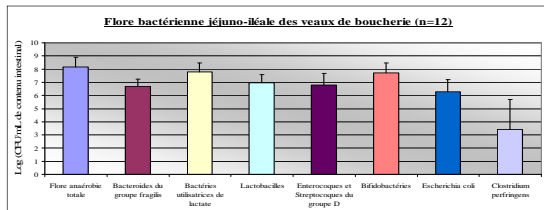
- 12 veaux Prim'Holstein
  - ✓ Agés de 20 semaines
  - ✓ Elevés sur caillebotis
  - ✓ Recevant un aliment d'allaitement standard
  - ✓ Abattus après 6 heures de jeûne, à l'abattoir expérimental de l'INRA de Theix
- Contenus jéjuno-iléaux
  - Mesure des paramètres physiologiques : température, pH et potentiel rédox
  - Dénombrements bactériens sur milieux de culture sélectifs



Marie CHAMPOD, 29 mars 2007

## Annexe I : Journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Avril 2007, Clermont-Ferrand, France.

### Caractérisation de la flore bactérienne

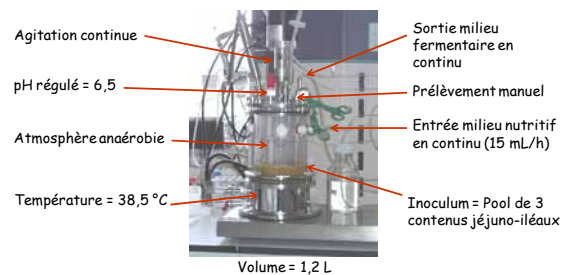


- Bonne reproductibilité interindividuelle
- Forte variabilité pour *Clostridium perfringens*

➔ Mise en place du fermenteur

Marie CHAMPOD, 29 mars 2007

### Mise en place du fermenteur

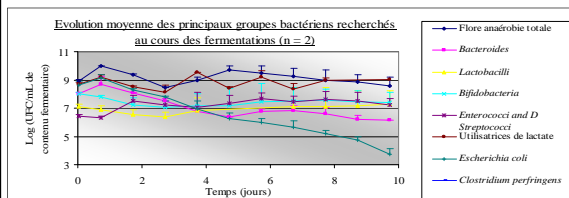


Durée fermentation : 10 jours

Nombre de répétitions : 2

Marie CHAMPOD, 29 mars 2007

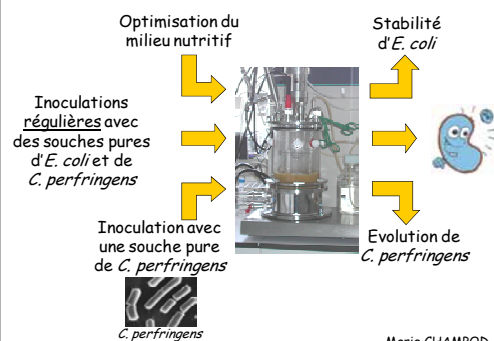
### Suivi de fermentation



- Bonne reproductibilité (n = 2)
- Stabilisation des principaux groupes bactériens en 5 à 6 jours, à des concentrations équivalentes à celles observées *in vivo*
- Diminution de la concentration en *Escherichia coli* au cours du temps
- *Clostridium perfringens* non mis en évidence

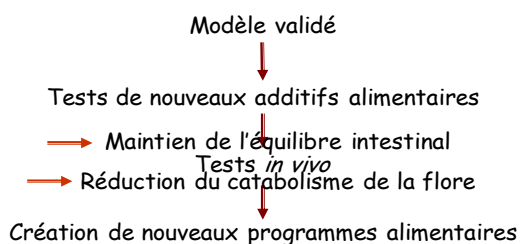
Marie CHAMPOD, 29 mars 2007

### Perspectives - 1



Marie CHAMPOD, 29 mars 2007

### Perspectives - 2



Marie CHAMPOD, 29 mars 2007

### Remerciements

**ERT CIDAM :**  
Monique Alric  
Stéphanie Blanquet  
Sylvain Denis  
et tous les membres de l'équipe

**AXISS France**  
François Gautier  
Laurence Mazuranok

**Denkavit Holland :**  
Adri van de Braak  
Lot Bos  
Peter Mölder  
Arjan Gobius

**INRA Abattoir expérimental**  
Roland Jailler  
et tout le personnel de l'abattoir

Merci de votre attention...

Marie CHAMPOD, 29 mars 2007

## Annexe II : Journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Avril 2007, Clermont-Ferrand, France.

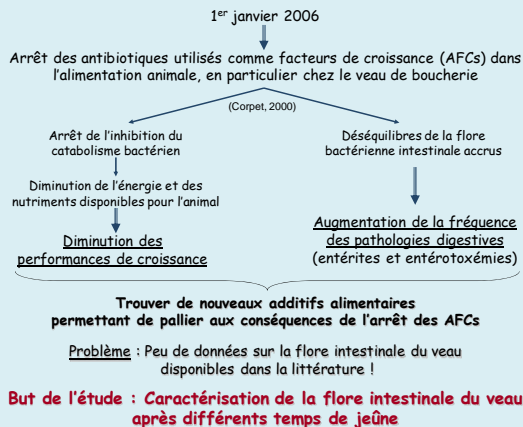
### Caractérisation de la microflore jéjuno-iléale du veau de boucherie et effet du temps de jeûne



Marie Champod, Stéphanie Blanquet-Diot, Sylvain Denis et Monique Alric  
ERT CIDAM, Faculté de Pharmacie, Université Clermont I



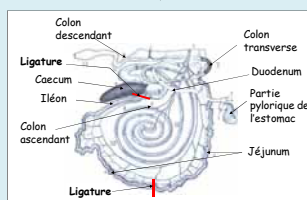
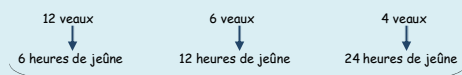
#### Contexte de l'étude



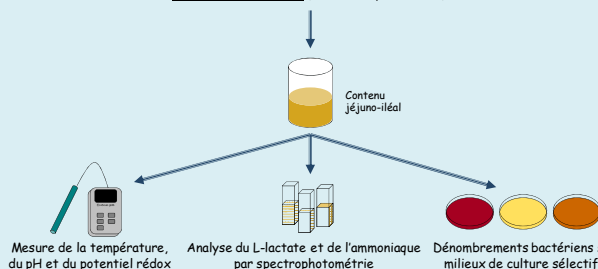
#### Matériels et méthodes

22 veaux de race Prim'Holstein :

- ✓ Agés de 20 semaines
- ✓ Elevés sur caillottes
- ✓ Recevant un aliment d'allaitement standard
- ✓ Abattus à l'abattoir expérimental de l'ONIA de Theix



Système digestif du veau (Mornet et Espinasse, 1977)



#### Résultats et Discussion

##### Paramètres physiologiques et métaboliques

###### pH

Temps de jeûne (heures)	6	12	24
pH	6,34	7,08	7,02
esm	0,51	0,26	0,10
n	12	6	4

pH mesurés en accord avec ceux indiqués dans la littérature (Jarrige et al., 1995)

pH à t = 6 h statistiquement ( $P < 0,05$ ) inférieur à ceux mesurés à 12 et 24 h

###### Potentiel d'oxydoréduction

Temps de jeûne (heures)	6	12	24
Potentiel rédox (mV)	-363,33	-394,33	-285,25
esm	128,14	55,94	182,13
n	12	6	4

Potentils d'oxydoréduction non statistiquement différents en fonction du temps de jeûne

Variabilité interindividuelle élevée

###### L-lactate

Temps de jeûne (heures)	6	12	24
[L-lactate] (g/L)	1,86	0,60	0,43
esm	2,09	0,26	0,02
n	11	6	4

Concentrations en lactate non statistiquement différentes en fonction du temps de jeûne

Variabilité interindividuelle inversement corrélée au temps de jeûne

###### Ammoniaque

Temps de jeûne (heures)	6	12	24
[Ammoniaque] (g/L)	0,14	0,15	0,13
esm	0,06	0,08	0,03
n	12	6	4

Concentrations en ammoniaque non statistiquement différentes en fonction du temps de jeûne

Variabilité interindividuelle faible

A 6 heures de jeûne → digestion en cours  
→ pH diminué par une activité métabolique plus intense

##### Dénombrements bactériens

###### 24 heures de jeûne

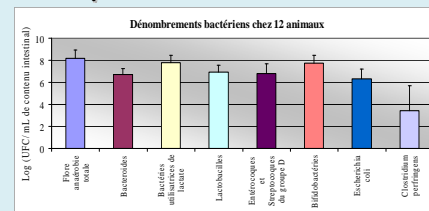
Veaux	Flore anaérobie totale	Bacteroides	Lactobacilli	Bifidobacteria	Enterococci	E. coli	C. perfringens
V5	5,20	<2	<2	2,25	<2	2,35	3,35
V6	5,04	4,47	4,51	4,08	4,00	4,81	2,30
V9	5,10	3,66	4,23	4,18	4,28	3,00	3,48
V10	4,10	2,57	3,50	3,55	3,54	2,45	0,00
Moyenne (log(UFC/mL))	4,48	3,57	4,08	3,57	3,94	3,18	2,20
ESM	0,59	0,67	0,38	0,56	0,26	0,81	1,10
Prévalence	100%	75%	75%	100%	75%	100%	100%

###### 12 heures de jeûne

Veaux	Flore anaérobie totale	Bacteroides	Lactobacilli	Bifidobacteria	Enterococci	E. coli	C. perfringens	Bactéries anaérobies de lactate
V21	7,68	6,10	7,23	6,45	<2	4,84	4,28	ND
V22	6,43	<2	3,28	<2	<2	2,23	2,53	ND
V23	6,31	4,41	4,89	4,81	<2	2,76	2,05	ND
V24	6,85	<2	<2	<2	<2	3,11	5,30	5,85
V25	6,54	<2	3,79	4,48	<2	2,52	4,92	6,02
V26	6,88	4,43	<2	<2	<2	2,36	5,12	6,41
Moyenne (log(UFC/mL))	6,78	4,98	4,80	5,25	<2	2,99	4,03	6,09
ESM	0,49	0,97	1,76	1,06	ND	1,01	1,40	0,29
Prévalence	100%	50%	67%	50%	0%	100%	100%	100%

24 et 12 heures de jeûne : chyme intestinal en faible quantité  
→ Développement de la flore en fonction des nutriments disponibles pour sa croissance  
→ Flore en concentration faible et variable entre les individus

###### 6 heures de jeûne



Concentrations proches de celles de la littérature (Hartman et al., 1966 ; Jenny et al., 1991 et Ishihara et al., 2001)

Variabilité faible sauf pour C. perfringens

6 heures de jeûne : digestion → Quantité de nutriments disponibles pour la flore très élevée  
→ Pas de compétition pour les substrats → Mise en place d'une flore en concentration élevée et peu variable

Conclusion : 6 h = temps de jeûne choisi pour établir la base de données sur la flore jéjuno-iléale du veau de boucherie

#### Perspectives

Mise en place d'un système *in vitro* modélisant l'environnement jéjuno-iléal du veau de boucherie → Screening de nouvelles substances susceptibles de remplacer les AFCs

Mise au point de nouveaux programmes alimentaires pour les veaux de boucherie

#### Références

- Corpet D., 2000. Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques. Revue Médicale Vétérinaire, 151 : 99-104.
- Hartman P., Morrill J., Jacobson N., 1966. Influence of diet and age on bacterial counts of ileal digesta and feces obtained from young calves. Applied microbiology, 14 : 70-73.
- Ishihara N., Chu D., Akashi S., Juneja L., 2001. Improvement of intestinal microflora balance and prevention of digestive and respiratory organ diseases in calves by green tea extracts. Livestock production sciences, 68 : 217-229.
- Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M.-H., Journet M., 1995. Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion. Edition INRA, Paris.
- Jenny B., Vandijk H., Collins J., 1991. Performance and fecal flora of calves fed a Bacillus subtilis concentrate. Journal of dairy science, 74 : 1968-1973.
- Mornet P., Espinasse J., 1977. Le veau, anatomie, physiologie, élevage, alimentation, production, pathologie. Edition Maloine, Paris.

## Annexe III : 15èmes Rencontres Recherche Ruminants, Décembre 2008, Paris, France.



## Caractérisation de la microflore intestinale du veau de boucherie et développement d'un système continu *in vitro* simulant cet écosystème

### Characterization of the intestinal microflora of the veal calves and development of an *in vitro* continuous system modelling this ecosystem

Marie Champod<sup>1</sup>\*, Jean-Michel Cardot<sup>2</sup>, Stéphanie Blanquet-Diot<sup>3</sup>, David Bravo<sup>1</sup> and Monique Alric<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>ERT CIDAM, Université Clermont-Ferrand I, CRNH Auvergne, IFR Santé 79 - 63000 Clermont-Ferrand - France  
<sup>2</sup>PANCOSMA SA, CH-1218 Le-Grand-Saconnex - Genève - Suisse



#### CONTEXTE ET OBJECTIFS

- Janvier 2006 : Interdiction des antibiotiques utilisés comme facteurs de croissance (AFCs) dans l'alimentation animale en Europe
  - Augmentation des pathologies gastro-intestinales et de la fréquence des morts subites chez le veau de boucherie
  - Objectif : Trouver de nouveaux additifs alimentaires pour minimiser ces conséquences
  - Action des AFCs intimement liée à l'équilibre de la microflore intestinale (Corpet, 2000 ; Dibner and Richards, 2005)
  - Expérimentation animale : coûteuse et non éthique
- Mettre au point un système *in vitro* de fermentation continue permettant l'évaluation des additifs alimentaires à forte potentialité sur la microflore intestinale du veau de boucherie

#### EXPERIMENTATION

##### Animaux



Veaux de boucherie  
 Prim'Holstein âgés  
 de 22 semaines

##### Milieux nutritifs

- M1 est une adaptation du milieu utilisé par Macfarlane *et al.* (1998) pour la modélisation du côlon humain
- M2 et M3 ont été établis à partir de la composition biochimique du contenu jéuno-iléal des veaux de boucherie

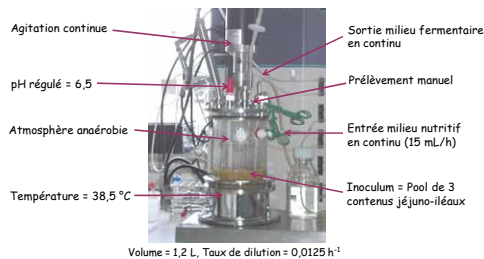
##### Design expérimental

- Caractérisation de la microflore *in vivo* :
  - 12, 6 et 4 veaux abattus après 6, 12 et 24 h de jeûne, respectivement
  - Dénombrements bactériens effectués sur le contenu jéuno-iléal
- Mise au point du système *in vitro* modélisant cet écosystème :
  - Système *in vitro* continu
  - Inoculum constitué du contenu jéuno-iléal de 3 veaux abattus après 6 h de jeûne
  - Essais avec 3 milieux nutritifs différents (n=3 pour chaque)
  - Énumération bactérienne du milieu fermentaire tous les jours pendant une semaine

##### Dénombrements bactériens

- Les groupes bactériens suivants ont été dénombrés :
  - Microflore anaérobie totale
  - Bactéroïdes
  - Lactobacilli
  - Bifidobactéries
  - Enterococci
  - Bactéries utilisatrices de lactate
  - Escherichia coli
  - Clostridium perfringens
- Groupes fonctionnels
- Espèces potentiellement pathogènes

##### Système *in vitro*



##### Analyses statistiques

Etats stables définis, comme une succession de 3 points présentant un coefficient de variabilité CV < 10%.

Après détermination des états stables, comparaison des résultats par les procédures Mean et GLM du logiciel SAS avec calcul de la variabilité inter-essais pour chaque milieu nutritif.

Les résultats obtenus avec le milieu permettant la stabilisation du plus grand nombre de groupes bactériens avec la plus faible variabilité inter-essais ont été comparés aux données *in vivo*.

#### RESULTATS ET DISCUSSION

##### Caractérisation de la microflore

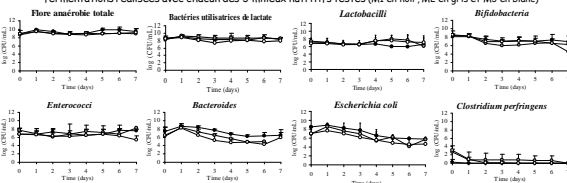
- Concentrations des groupes bactériens dénombrés inversement corrélées au temps de jeûne des veaux.
- Plus faible variabilité inter-individuelle à 6 h de jeûne.
- Temps de jeûne de 6 h choisi

- Pour créer une base de données sur le contenu intestinal des veaux de boucherie
- Pour la suite des expériences.

##### Modélisation *in vitro*

##### Données brutes

Figure 2 : Evolution moyenne (n=3) des populations bactériennes énumérées au cours des fermentations réalisées avec chacun des 3 milieux nutritifs testés (M1 en noir, M2 en gris et M3 en blanc)



- Stabilisation des grands groupes bactériens fonctionnels à leur niveau initial
- E. coli stabilisé à un niveau plus faible qu'au temps initial
- C. perfringens disparaît du système en 24 heures.

##### Analyses statistiques

Table 1 : Nombre d'états stables obtenus via la méthode d'analyse statistique et coefficients de variabilité (CV) inter-réplicats au cours des états stables, par population bactérienne et par milieu nutritif

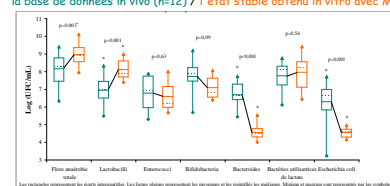
Population bactériennes	M1		M2		M3	
	Ratio d'états stables	CV inter-essais	Ratio d'états stables	CV inter-essais	Ratio d'états stables	CV inter-essais
Flora anaérobie totale	3/3	9 %	3/3	7 %	3/3	12 %
Bactéries utilisatrices de lactate	2/3	19 %	3/3	8 %	3/3	30 %
Lactobacilli	3/3	24 %	2/3	16 %	2/3	14 %
Bifidobactéries	2/3	44 %	1/3	ND	2/3	16 %
Enterococci	2/3	7 %	2/3	49 %	2/3	40 %
Bactéroïdes	3/3	29 %	1/3	ND	2/3	25 %
Escherichia coli	1/3	ND	2/3	40 %	2/3	1 %

- M1 et M3 : résultats globalement équivalents concernant le nombre de populations bactériennes stabilisées.
- M2 : milieu le moins intéressant avec 2 populations stabilisées une seule fois sur 3.
- M3 : milieu avec la plus faible variabilité inter-essais pour 4 des 7 populations étudiées.

M3 choisi pour la suite des expériences

##### Comparaison entre les résultats obtenus avec M3 et la base de données *in vivo*

Figure 3 : Comparaison des niveaux de populations bactériennes entre la base de données *in vivo* (n=12) / l'état stable obtenu *in vitro* avec M3



- Pas de différence significative : Flore anaérobie totale, Bifidobactéries, Enterococci et bactéries utilisatrices de lactate
- Stabilisation à un niveau significativement inférieur à l'*in vivo* : Bactéroïdes et E. coli
- Stabilisation à un niveau significativement supérieur à l'*in vivo* : Lactobacilli
- Pour toutes les populations sauf les bactéries utilisatrices de lactate : variabilité inférieure *in vitro* comparée à l'*in vivo*, avec une distribution plus restreinte.
- Réduction de la variabilité interindividuelle lors de la modélisation *in vitro*, créant une microflore « modèle ».

#### CONCLUSION



Une base de données concernant les principaux groupes bactériens cultivables de l'écosystème intestinal du veau de boucherie est désormais disponible. Cet écosystème semble présenter un état stable 6 heures après le repas, avec une faible variabilité entre les animaux. Un système de modélisation *in vitro* de cette flore a également été mis au point. Le milieu M3 semble être le plus intéressant car il permet la stabilisation d'un plus grand nombre de flores avec la plus faible variabilité. Cette bonne reproductibilité permettra d'étudier les effets relatifs de divers additifs alimentaires, pouvant potentiellement remplacer les AFCs, sur la microflore intestinale du veau de boucherie.

#### Références

- Corpet D., 2000. Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques. Revue Médicale Vétérinaire, 151: 99-104.  
 Dibner, J. J. and Richards, J. D. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Poultry Science, 84: 634-643.  
 Macfarlane G. T., Macfarlane S. and Gibson G. R. 1998. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. Microbial Ecology, 35: 180-187.



## Annexe IV : Gut Microbiome INRA-RRI 2008, Juin 2008, Clermont-Ferrand, France.

## Set up of a continuous in vitro system modelling the jejuno-ileal ecosystem of veal calves

Marie Champod

Workshop "Models of digestive ecosystems: *in vitro* simulations and gnotobiotic animals"

Gut Microbiome INRA-RRI 2008

## Background

January 2006

~~Agres~~ → Intestinal microflora → Growth performances  
Animal health

↓ Probable consequences for the veal calves:

- Decrease of the growth performances
- Increase of the intestinal pathologies frequency

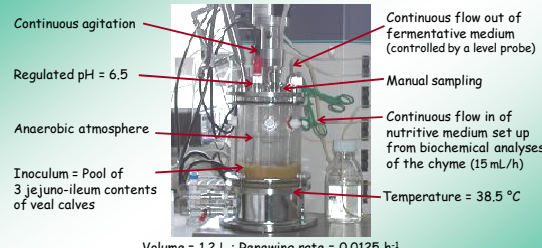
Veal calves industry → Development of new feed additives

→ Screening potentially new feed additives

- o In vivo studies: breeding parameters and mortality rate
- o In vitro studies: impact on the intestinal microflora
  - ★ Ethical and economical reasons
  - ★ To study the primary effects of the additives

M. CHAMPOD - Workshop "Models of digestive ecosystems: *in vitro* simulations and gnotobiotic animals" - Gut Microbiome INRA-RRI 2008

## In vitro system



Daily analyses of bacterial groups, gas production and fermentation metabolites  
7 to 10 days of fermentations

M. CHAMPOD - Workshop "Models of digestive ecosystems: *in vitro* simulations and gnotobiotic animals" - Gut Microbiome INRA-RRI 2008

## Potentialities of the model

- ★ Stabilization (> 1 week) of the main functional bacterial groups:  
Total anaerobic and aerobic microflora  
*Lactobacilli*, *Enterococci*, *Bifidobacteria* and *Bacteroides*  
Lactate-utilizing bacteria  
*Escherichia coli*
- ★ Maintenance of metabolic activity (lactate, ammonia and short chain fatty acids)
- ★ Minimization of the inter-individuals variability  
→ Creation of a "model" microflora
- ★ Possibility to evaluate the effects of different treatments on the functional bacterial groups over long periods

BUT

- Simplification of the ecosystem: lose of some specific species
- No simulation of the intestinal wall:
  - No active or enhanced absorption → Accumulation of some metabolites
  - No support for attached-bacteria

M. CHAMPOD - Workshop "Models of digestive ecosystems: *in vitro* simulations and gnotobiotic animals" - Gut Microbiome INRA-RRI 2008

## Possible applications

- Screening of feed additives allowing a beneficial action on the intestinal microflora equilibrium of the veal calves:
  - Prebiotics
  - Probiotics
  - Organic acids
  - Essential oils
- Fundamental study of the veal calves microflora
  - Kinetics
  - Metabolism
  - ...

M. CHAMPOD - Workshop "Models of digestive ecosystems: *in vitro* simulations and gnotobiotic animals" - Gut Microbiome INRA-RRI 2008

## Annexe V : BioMicroWorld-2007, Novembre – Décembre 2007, Seville, Espagne.

## Influence of the nutritive medium on the stabilization, in a continuous *in vitro* system, of selected bacterial groups from the jejunum-ileum of veal calves



Marie Champod<sup>†</sup>, Stéphanie Blanquet-Diot<sup>\*</sup>, Sophie Gonzalez<sup>\*</sup>, David Bravo<sup>†</sup> and Monique Alric<sup>\*</sup>  
<sup>\*</sup>ERT CIDAM, Faculty of Pharmacy, University of Clermont-Fd I, France  
<sup>†</sup>PANCOSMA SA, Le-Grand-Saconnex, Switzerland



### Context of the study

- o 1<sup>st</sup> of January 2006 : Prohibition of the antibiotics used as growth promoters in animal feed (Regulation EC N° 1831/2003)
    - Decrease of animal growth performances
    - Rise of intestinal pathologies due to *Escherichia coli* or *Clostridium perfringens*
  - o The functioning of antibiotics used as growth promoters was closely linked to the intestinal microflora equilibrium (Dibner and Richards, 2005 ; Corpet, 2000)
    - ✓ New feed additives able to preserve the intestinal microflora equilibrium
    - ✓ *In vitro* systems simulating the intestinal environment of calves = a good alternative to animal experimentation
- Goal of this study : **Set up a continuous *in vitro* system reproducing the jejunum-ileum bacterial ecosystem of the veal calf**

### Materials and Methods

#### The animals

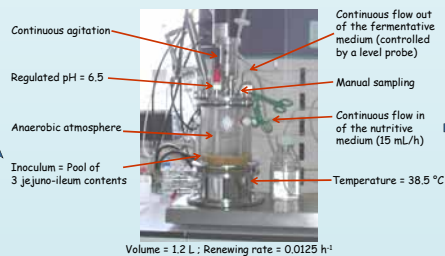
- ✓ Prim'Holstein veal calves
- ✓ 20 weeks old
- ✓ Slaughtered after 6 hours fasting

#### The experiment design

- ✓ 2 repetitions for each nutritive medium
- ✓ Enumeration every day during 1 week of the following bacterial groups:
  - Total anaerobic microflora
  - *Bacteroides*
  - *Lactobacilli*
  - *Bifidobacteria*
  - *Enterococci*
  - Lactate utilizing bacteria
  - *Escherichia coli*
  - *Clostridium perfringens*

Functional groups  
Pathogenic species

#### The fermentor



#### The three nutritive media

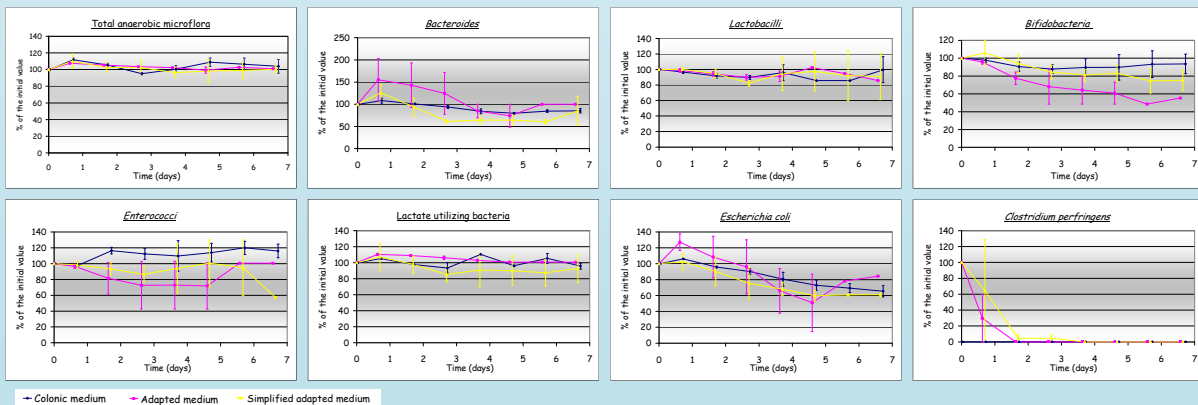
Compounds	Adapted medium (g/L)	Simplified adapted medium (g/L)	Colonic medium (g/L)
Glucose	5.00	5.00	5.00
Galactose	5.00	5.00	5.00
Lactose	5.00	5.00	5.00
Protein	5.00	5.00	5.00
Xylan	5.00	5.00	5.00
Corn starch	5.00	5.00	5.00
Arabinogalactan	5.00	5.00	5.00
Monosaccharide cellulose	5.00	5.00	5.00
Arabic gum	5.00	5.00	5.00
Casein	5.00	5.00	5.00
Protein starch	5.00	5.00	5.00
Mucin from porcine stomach	5.00	5.00	5.00
Hydrolyzed meat contents	5.00	5.00	5.00
Hydrolyzed yeast	5.00	5.00	5.00
Capsaicin	5.00	5.00	5.00
Yeast extract	5.00	5.00	5.00
Tween 80 (saturated lipid)	5.00	5.00	5.00
Complete mixture of lipids	5.00	5.00	5.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	5.00	5.00	5.00
NaCl	5.00	5.00	5.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.00	5.00	5.00
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.00	5.00	5.00
Bio salts	5.00	5.00	5.00
Hepes	5.00	5.00	5.00
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5.00	5.00	5.00
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	5.00	5.00	5.00
L-Cysteine-HCl	5.00	5.00	5.00
D-biotin	5.00E-06	5.00E-06	5.00E-06
Vitamin B12	2.00E-07	2.00E-07	2.00E-07
D-pantoic acid	5.00E-06	5.00E-06	5.00E-06
Monosaccharide	5.00E-06	5.00E-06	5.00E-06
4-aminobenzoic acid	5.00E-06	5.00E-06	5.00E-06
Thiamin	2.00E-06	2.00E-06	2.00E-06
Menadione	2.00E-07	2.00E-07	2.00E-07
Anti-foam A	0.75 mL	0.75 mL	0.75 mL

Adapted and simplified adapted media were established from the biochemical analyses of the jejunum-ileum contents of 12 veal calves

Colonic medium was adapted from that described by Macfarlane *et al.* 1998 for the human colon

Compared to the Adapted medium :  
Added Suppressed

### Results



- > The total anaerobic microflora was stabilized close to the *in vivo* level (= initial value = 100%), whatever the nutritive medium tested.
- > The colonic medium seemed to allow a better stabilization of the *Bifidobacteria* and *Enterococci* compared to the other nutritive media, no difference being observed between the three media for the other bacterial groups.
- > The colonic medium allowed a stabilization of the total anaerobes, the *Lactobacilli*, the *Bifidobacteria* and the lactate utilizing bacteria at a level close to the *in vivo* one - less than 1 Log (UFC/mL of content) of difference. *Enterococci* and *Bacteroides* were stabilized at  $\pm 20$  % of the initial level.
- > Globally, the results obtained with the adapted and the simplified adapted media were less reproducible and more distant from *in vivo* data than that obtained with the colonic medium.
- > None of the tested media was able to stabilize *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*.

### Conclusion and Perspectives

- > **Conclusion:**
  - The colonic medium seemed to be the one able to stabilize the maximum of bacterial groups, both at a level close to that observed *in vivo* and with the best reproducibility.
  - None of the nutritive media tested allowed the stabilization of the pathogenic species.
- > **Perspectives:**
  - o Confirm these results with one more replicate of each experiment.
  - o Inoculate the *in vitro* model with pathogenic species from banks to try to stabilize these strains.
  - o Once validated, use the fermentor to do a pre-screening of different new feed additives.
  - o Test in the veal calves the feed additives selected *in vitro*.

### References

- Corpet D., 2000. Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques. *Revue Médicale Vétérinaire*, 151: 99-104.  
 Dibner J. J. and Richards J. B., 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*, 84: 634-643.  
 Macfarlane G. T., Macfarlane S. and Gibson G. R., 1998. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microbial Ecology*, 35: 180-187.

**Annexe VI : Gut Microbiome INRA-RRI 2008, Juin 2008, Clermont-Ferrand, France.**

### Set up of a continuous in vitro system modelling the jejunum-ileal ecosystem of veal calves



Marie Champod<sup>†</sup>, Jean-Michel Cardot\*, Stéphanie Blanquet-Diot\*, David Bravo<sup>†</sup> and Monique Alric\*  
<sup>\*</sup>ERT CIDAM, Faculty of Pharmacy, University of Clermont-Fd I, CRNH Auvergne, IFR Santé 79, France  
<sup>†</sup>PANCOSMA SA, Le-Grand-Saconnex, Geneva, Switzerland



## CONTEXT AND OBJECTIVE

- ♦ January 2006: Interdiction of all the antibiotics used as growth promoters (AGPs) in animal feed in Europe
  - ↳ Increase of gastrointestinal pathologies and sudden death frequency for veal calves
    - ⇒ Objective: Find new feed additives minimizing these consequences
- ♦ Action of AGPs closely linked to the intestinal microflora equilibrium (Corpet, 2000 ; Dibner and Richards, 2005)
- ♦ In vivo experimentation: expensive and non ethical

Set up a continuous in vitro system of fermentation allowing the evaluation of potentially new feed additives on the veal calves intestinal microflora

## EXPERIMENTATION

### Experimental design

- ✓ 3 different nutritive media (n=3)
- ✓ Enumeration every day during 1 week of the following bacterial groups:
  - Total anaerobic microflora
  - *Bacteroides*
  - *Lactobacilli*
  - *Bifidobacteria*
  - *Enterococci*
  - Lactate utilizing bacteria
  - *Escherichia coli*
  - *Clostridium perfringens*

Functional groups

Pathogenic species

### Nutritive media

[illegible]

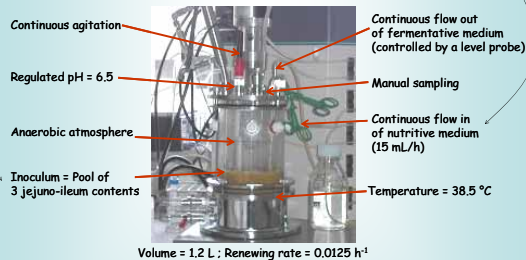
- ✓ M1 is adapted from medium described by Macfarlane *et al.* 1998 for the human colon
- ✓ M2 and M3 are established from the biochemical analyses of the jejunum-ileum contents of 12 veal calves

### Animals



20 weeks old Prim'Holstein  
veal calves slaughtered  
after 6h fasting

### In vitro system



### Statistical analyses

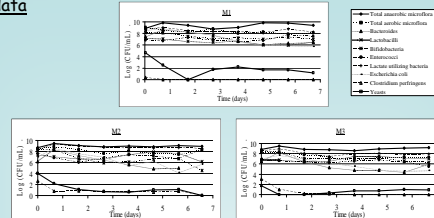
A stabilized state is defined, by replicate, as a sequence of minimum 3 following time points with a coefficient of variability (CV) lower than 10%.

Once stabilized states defined, the results are analysed with the procedures Mean and GLM of the SAS software to determine the differences between the media and the variability inter-replicates affected to each medium.

The results obtained with the medium which has obtained the highest number of stabilized bacterial populations, with the lowest variability inter-replicates have then been compared with data obtained during an in vivo characterization of the bacterial populations of 12 veal calves, by a one-way variance analysis.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Raw data



**Figure 1: Mean evolution (n=3) of the bacterial populations during the fermentations with the three nutritive media**

### Comparison between the media

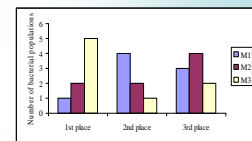
Bacterial populations	M1	M2	M3
Total anaerobic microflora	3/3	3/3	3/3
Lactobacilli	3/3	2/3	2/3
Bifidobacteria	2/3	1/3	2/3
Enterococci	2/3	2/3	2/3
Bacteroides	3/3	1/3	2/3
Lactate utilizing bacteria	2/3	3/3	3/3
Total aerobic microflora	1/1	1/3	3/3
<i>Escherichia coli</i>	1/3	2/3	2/3

**Table 1: Number of stable replicates by bacterial populations and by nutritive medium**

Media M1 and M3 appear to be equivalent for the number of stabilized bacterial populations whereas M2 shows clearly less interesting results with 3 bacterial populations stabilized for only 1 replicate out of 3.

Bacterial populations	M1	M2	M3
Total anaerobic microflora	9 %	7 %	12 %
Lactobacilli	24 %	16 %	14 %
Bifidobacteria	43 %	-	16 %
Enterococci	7 %	48 %	40 %
Bacteroides	29 %	-	25 %
Lactate utilizing bacteria	19 %	8 %	30 %
Total aerobic microflora	-	-	28 %
Escherichia coli	-	40 %	0.8 %

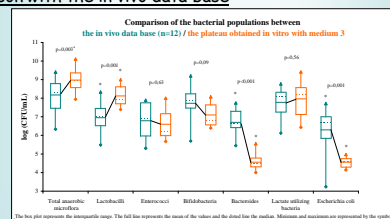
**Table 2: Coefficients of variability inter-replicate by bacterial population and by nutritive medium**



**Figure 2:** Number of bacterial populations for which each nutritive medium obtained the 1st, 2nd or 3rd place in what concerns the CV inter-replicates

It appears clearly that M3 obtains the best results in term of variability inter-replicates as it has, for 5 bacterial populations out of 8, the lowest variability among the 3 media. Therefore, this medium will be used for the followings of the project as the reproducibility of the experiment is the most important criterion to allow the analyses of the future results.

### Comparison with the in vivo data base



**Figure 3:** Box plot representation of the variance analysis comparing the results obtained during the plateau with M3 and the in vivo data base

The results obtained with M3 are not statistically different from the *in vivo* data base for the total anaerobic microflora, the Bifidobacteria, the Enterococci and the lactate utilizing bacteria. However, the Bacteroides and *E. coli* were stabilized at a significantly lower level than *in vivo* and, at the contrary, the Lactobacilli were stabilized at a higher level.

Moreover, it can be observed that for all the bacterial populations, except for the lactate utilizing bacteria, the variability of the data have been reduced in vitro, compared to in vivo data (lower number of extreme values observed). This means that, even if the system is inoculated with different intestinal contents each time, the system tend to reduce this natural variability to create a "model" intestinal microflora.

## CONCLUSION

The nutritive medium M3 allowed the stabilization of the bacterial groups enumerated (except *Cl. perfringens*) with a good reproducibility between the replicates. However, the Bacteroides, the Lactobacilli and *E. coli* were not stabilized at their in vivo level and these limits of the model have to be kept in mind for the further studies. Moreover, the microflora produced fermentative metabolites as lactate, ammonia and short chain fatty acids (data not shown) which proves that the bacterial ecosystem kept its metabolic activity. Thus, this in vitro system will allow the assessment of the relative effects on the digestive microflora of the veal calves of new feed additives potentially able to replace the AGPs. The effort will be concentrated on essential oils and plant extracts that are natural products with known effects on bacteria.

## References

- Corpet D., 2000. Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques. *Revue Médicale Vétérinaire*, 151: 99-104.
- Johnson, J., Bouillon-Buendia, J. D., 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Veterinary Science*, 150: 643-645.
- Macfarlane G. T., Macfarlane S., and Gibson G. R. 1998. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microbial Ecology*, 35: 180-187.

# Annexe VII : 2008 Joint ADSA-ASAS Meeting, Juillet 2008, Indianapolis, Indiana, Etats-Unis.



Marie Chamois<sup>1</sup>, Stéphanie Blonquet-Diot<sup>1</sup>, David Bravo<sup>1</sup> and Monique Alinc<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>ERT CIDAM, Faculty of Pharmacy, University of Clermont-Fd I, CNRS Auvergne, IFR Santé 79, France  
<sup>2</sup>PANCOSMA SA, Le-Grand-Saconnex, Geneva, Switzerland

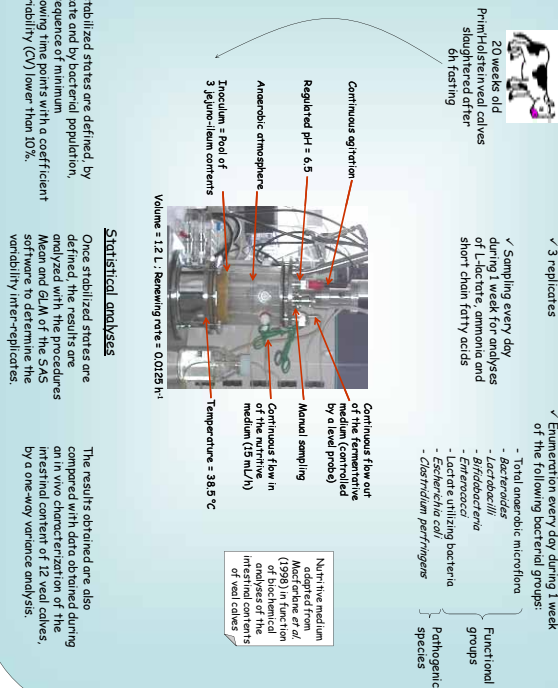
## Validation of a continuous in vitro system modeling the jeuno-ileal ecosystem of veal calves

### CONTEXT

- January 2006: Interdiction of all the antibiotics used as growth promoters (AGPs) in animal feed in Europe  
 Consequences: Increase of the gastrointestinal pathologies and sudden death frequency for the veal calves
- Objective: Find new feed additives minimizing these consequences
- Action of AGPs closely linked to the intestinal microflora equilibrium (Carpentier, 2000; Dierckx and de Boer, 2005)
- In vivo experimentation: expensive and non ethical

Set up a continuous in vitro system of fermentation allowing the evaluation of potentially new feed additives on the veal calves intestinal microflora

### EXPERIMENTAL DESIGN



### CONCLUSION

This in vitro system allowed the stabilization of the bacterial groups enumerated (except *C. perfringens*) with a good reproducibility between the replicates. However, the *Bacteroides*, the *Lactobacilli* and *E. coli* were not stabilized at their in vivo level and these limits of the model have to be kept in mind for the further studies. Moreover, the microflora produced fermentative metabolites, which proves that the bacterial ecosystem kept its metabolic activity. Their high concentrations will have to be lower than their toxic levels to avoid the inhibition of the microflora. Thus, this in vitro system will allow the assessment of the relative effects of new feed additives potentially able to replace the AGPs, on the digestive microflora of the veal calves. The effort will be concentrated on natural products as essential oils and plant extracts.

### References

- Carpentier, 2000. Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques. Revue Médicale Vétérinaire, 151: 99-104.  
 Dierckx, J. J. and de Boer, J. D. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Veterinary Science, 24: 634-643.  
 Macfartlane, G. T., Macfartlane, S. and Gibson, G. R. 1998. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. Microbial Ecology, 35: 180-187.  
 2008 Joint ADSA-ASAS Meeting - Indianapolis - Indiana - United States

### RESULTS AND DISCUSSION

#### Bacterial populations

The in vitro system allows the stabilization of the bacterial populations for at least 2 replicates out of 3 from day 5, except for *C. perfringens* which disappears from the fermenter at the 2<sup>nd</sup> day of the experiments. The variability inter-replicates is evaluated by the bacterial population and ranges from 1% for *E. coli* to 40% for the *Enterococci*, with a mean value of 21%.

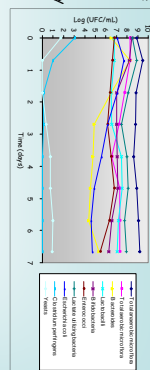


Figure 1: Evolution of the bacterial populations along the fermentation

#### Metabolites

The microflora produces L-lactate, ammonia and SCFA, which confirms that the bacteria conserve their metabolic activity in this in vitro system. The production of L-lactate happens 3 days after the beginning of the fermentation, which illustrates the time needed by the bacteria to produce more lactate than the lactate consumed by the bacteria utilized by the system.

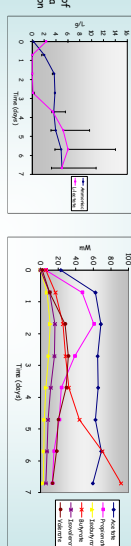


Figure 2: Evolution of the metabolites along the fermentation

The production of L-lactate happens 3 days after the beginning of the fermentation, which illustrates the time needed by the bacteria to produce more lactate than the lactate consumed by the bacteria utilized by the system. The production of ammonia and SCFA is constant until the end of the experiment, which means that the rate of production is equal to the rate of consumption and emptying. Butyrate concentration is increasing all along the experiment, which signifies that the bacteria produce more than the rate of emptying, whereas the other SCFA are decreasing after 4 days of fermentation.

#### Comparison with the in vivo data base

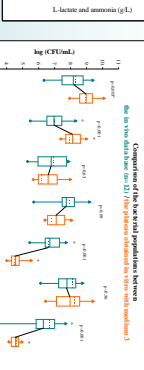
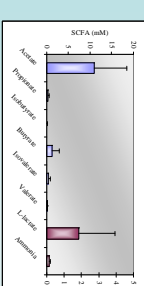


Figure 4: Comparison of the metabolites between in vivo and in vitro

The values obtained for the metabolites in the in vitro system (Fig. 2 and 3) are much higher than those observed in vivo (Fig. 4). This is due to the fact that the system does not allow absorption of fermentation products as the intestinal wall does in vivo. The concentrations of the bacterial groups obtained at the stabilized states are not statistically different from those of the in vivo data base. For the total anaerobic microflora, the *Bifidobacteria*, the *Enterococci* and the lactate-utilizing bacteria. However, the *Bacteroides* and *E. coli* were stabilized at a significantly lower level than that observed in vivo and, at the contrary, the *Lactobacilli* were stabilized at a higher level. Moreover, it can be observed that for all the bacterial populations, except for the lactate-utilizing bacteria, the variability of the data have been reduced in vitro, compared to in vivo because a lower number of extreme values is observed. This means that, even if the system is inoculated with different intestinal contents each time, the system would tend to reduce this natural variability to create a 'model' intestinal microflora.